

109. Hans Brockmann, Klaus Bauer und Ilse Borchers: Rhodomycin, ein rotes Antibioticum (Antibiotica aus Actinomyceten, VII. Mitteil. *)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 11. Juni 1951)

Aus *Streptomyces purpurascens* (nov. spec.) wurde ein rotes, gegen *Staphylococcus aureus* stark wirksames Antibioticum, das Rhodomycin, als kristallisiertes Perchlorat isoliert. Rhodomycin enthält Stickstoff, ist amphoter und wird durch Säure zu roten, stickstofffreien, antibiotisch wirksamen und farblosen unwirksamen Verbindungen abgebaut. Das eine der farbigen Abbauprodukte wurde kristallisiert erhalten. Durch Gegenstromverteilung ließ sich das Antibioticum in zwei Fraktionen mit gleich starker Wirksamkeit, das Rhodomycin A und B zerlegen. Ein erheblicher Teil des Antibiotiums ist im Mycel gebunden und wird erst durch milde Säureeinwirkung freigelegt.

In einer Zusammenstellung der farbstoffbildenden Actinomyceten-Stämme, die bisher in unserem Institut isoliert worden sind¹⁾, haben wir als 4. Gruppe solche Stämme zusammengefaßt, die wasserlösliche, rote, mit Alkali blau oder violett werdende Farbstoffe bilden²⁾. Bei einem Vertreter dieser Gruppe, der von W. Lindenbein³⁾ als neue Species erkannt und *Streptomyces purpurascens* genannt wurde, zeigte die nach Entwicklung des Mycels rot gewordene, als Nährstoffe Glycerin und Glykokoll enthaltende Kulturflüssigkeit starke antibiotische Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*.

Unsere Versuche, das Antibioticum des neuen Stammes zu isolieren, gingen von der Annahme aus, daß die bakterio statische Wirkung der Kulturlösung durch deren roten Farbstoff hervorgerufen wird; denn sein Verhalten war dem der Oxybenzochinone bzw. Oxynaphthochinone ähnlich, von denen manche durch antibiotische Wirkung ausgezeichnet sind. Diese Arbeitshypothese, die zunächst in der bei Anreicherungsversuchen beobachteten Proportionalität zwischen Farbstoffgehalt und antibiotischer Wirksamkeit eine Stütze fand, hat sich durch die Isolierung des roten Antibiotiums Rhodomycin⁴⁾ als richtig erwiesen.

I.) Die Isolierung des Rhodomycins

Die ersten Konzentrate des Antibiotiums erhielten wir durch Extraktion der roten Kulturlösung mit Butylacetat und Behandlung des Butylacetat-Rückstandes mit Benzol. Dabei hinterblieb ein rotes Öl, welches das Wachstum von *Staphylococcus aureus* noch in der hohen Verdünnung $1:1.5 \times 10^6$ hemmte. Durch Behandeln mit Tetrahydrofuran ließen sich daraus erhebliche Mengen unwirksamer Begleitstoffe entfernen. Der rote, pulverige Rückstand, im folgenden als Tetrahydrofuran-Fraktion bezeichnet, war gegen *St. aureus* bis $1:3 \times 10^7$ wirksam. Er löste sich mit roter Farbe in Wasser und

*) VI. Mitteil.: B. 84, 284 [1951].

¹⁾ Die Isolierung der Stämme wurde von W. Lindenbein u. I. Olfermann durchgeführt. ²⁾ H. Brockmann, H. Pini u. O. v. Plotho, B. 83, 162 [1950].

³⁾ Unveröffentlicht. ⁴⁾ H. Brockmann u. K. Bauer, Naturwiss. 37, 492 [1950].

ließ sich mit Ammoniumsulfat wieder ausfällen. Beim Erwärmen der wäßrigen Lösung mit verd. Salzsäure wird das Antibioticum in einen farblosen, wasserlöslichen Anteil und eine als roter Niederschlag ausfallende Komponente gespalten, die im Gegensatz zum Ausgangsmaterial in Äther löslich ist. Dieser Niederschlag hemmte *St. aureus* bis zur Verdünnung 1 : 300000.

Die Bereitung größerer Mengen der, wie sich später herausstellte, an Rhodomycin bereits weitgehend angereicherten Tetrahydrofuran-Fraktion wurde dadurch erschwert, daß die Kulturflüssigkeit bei der Extraktion mit Butylacetat schwer zu brechende Emulsionen bildete und bei manchen Ansätzen überdies nur wenig Antibioticum enthielt. Wir haben daher zunächst untersucht, ob sich auch aus dem meist kräftig rot gefärbten Mycel unseres Stammes Rhodomycin gewinnen läßt. Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln entfernte neben farblosen auch rote, antibiotisch schwach wirksame Inhaltsstoffe, die Hauptmenge des Farbstoffes blieb jedoch im Mycel. Da dieses Verhalten auf eine Bindung an Zellbestandteile hindeutete, haben wir versucht, den Farbstoff durch Säurehydrolyse freizulegen, die selbstverständlich so durchzuführen war, daß die oben erwähnte Säurespaltung des Antibioticums vermieden wird. Tatsächlich gelang es mit 80-proz. Aceton, das 2% Schwefelsäure enthielt, erhebliche Mengen Rhodomycin aus dem Mycel herauszulösen, ein Befund, der insofern bemerkenswert ist, als er zeigt, daß es bei der Suche nach neuen Antibiotica u. U. nicht genügt, allein die Kulturlösung auf Wirksamkeit zu prüfen. Um die Extraktion zu beschleunigen, wurden die Mycelzellen durch Ausfrieren zerstört.

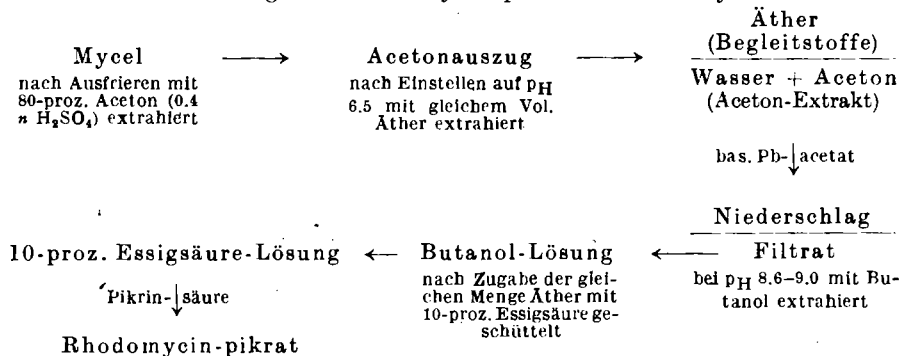
Aus dem tiefroten, mit Natriumcarbonat auf pH 6.5 eingestellten Acetonauszug konnten durch Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Äther unwirksame Begleitstoffe abgetrennt werden. Sie gingen in die Ätherphase, während das Antibioticum in der im folgenden als Acetonextrakt bezeichneten unteren Phase verblieb, die als Ausgangsmaterial für die Anreicherungsversuche diente. Von großem Wert für diese Versuche war die Beobachtung, daß Rhodomycin nicht nur saure, sondern auch basische Eigenschaften hat und deshalb aus seiner wäßrigen, wäßrig-alkoholischen oder wäßrig-acetonischen Lösung mit Pikrinsäure, Pikrolonsäure und einer Reihe anderer Basen-Fällungsmittel abgeschieden werden kann. Wegen seines amphoterer Charakters ist das Antibioticum aus wäßriger Lösung nur in der Nähe seines isoelektrischen Punktes (pH 8.5) mit organischen Solvenzien extrahierbar.

Der naheliegende Versuch, das Antibioticum aus dem mit Wasser verdünnten Acetonextrakt durch Pikrinsäure auszufällen, verlief unbefriedigend. Der braunrote Niederschlag enthielt zwar das gesamte Rhodomycin, daneben aber so reichliche Mengen an Begleitstoffen, daß die Abtrennung von reinem Rhodomycin-pikrat nicht gelang. Es war also notwendig, die mit Pikrinsäure fällbaren unwirksamen Anteile des Acetonextraktes vor der Pikrat-Fällung so weit wie möglich auf anderem Wege zu entfernen. Das gelang z.Tl. durch Fällung mit basischem Bleiacetat, bei der das Rhodomycin in Lösung blieb.

Das mit Natriumhydrogencarbonat von überschüssigem Bleisalz befreite Filtrat dieser Fällung wurde auf pH 8.6–9.0 eingestellt und mit Butanol ausgeschüttelt. Aus der roten Butanolösung ließ sich nach Verdünnen mit dem

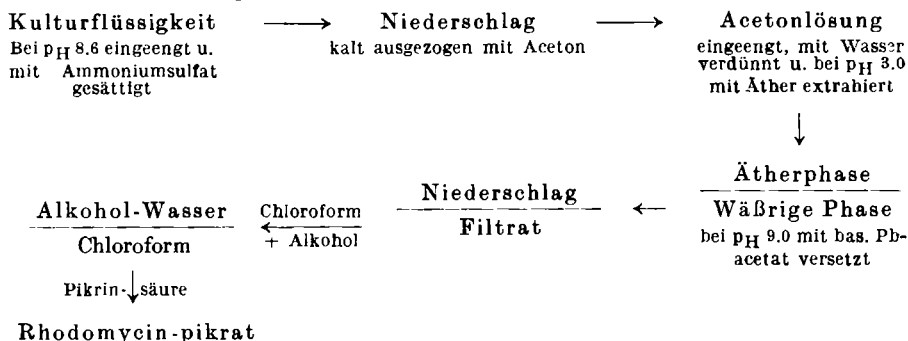
gleichen Vol. Äther das Antibioticum auf Grund seiner basischen Eigenschaft leicht in 10-proz. Essigsäure überführen, während Begleitstoffe in der Butanol-Äther-Phase zurückblieben. Auf Zusatz von Pikrinsäure schied sich aus der essigsauren Lösung hellrotes, amorphes Pikrat ab, das gegen *St. aureus* bis zur Verdünnung $1:5 \times 10^7$ wirksam war. Dieses nahezu reine Rhodomycin-pikrat diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche. Das folgende Schema gibt den Gang der Anreicherung wieder.

Gewinnung von Rhodomycin-pikrat aus dem Mycel



Als zur Rhodomycin-Gewinnung in größerem Maßstabe an Stelle der Oberflächenkultur das Submersverfahren angewandt wurde⁵⁾, fielen große Mengen roter Kulturlöslichkeit an, für deren Aufarbeitung der oben beschriebene Weg zu umständlich und kostspielig war.

Gewinnung von Rhodomycin-pikrat aus der Kulturlösung



Ein brauchbares Verfahren zur Gewinnung von Rhodomycin aus der Kulturlösung ergab sich aus der Beobachtung, daß das Antibioticum in der Nähe seines isoelektrischen Punktes mit Ammoniumsulfat aus wäßriger Lösung ausgefällt werden kann. Auf die i. Vak. auf den fünfzigsten Teil ihres ursprünglichen Volumens eingeengte rote Kulturlösung angewandt, lieferte diese Fällungsmethode einen Niederschlag, der die Gesamtmenge des Antibioticums enthielt. Beim Behandeln mit Aceton gewannen wir daraus einen

⁵⁾ Dieses Verfahren wurde von Dr. Bohne im Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer entwickelt.

dunkelroten Auszug, dem nach Einengen, Verdünnen mit Wasser und Einstellen auf pH 3.0 durch erschöpfende Extraktion mit Äther unwirksame Begleitstoffe entzogen werden konnten. Nachdem bei pH 9.0 ein weiterer Anteil unwirksamer Beimengungen mit basischem Bleiacetat ausgefällt war, wurde das vom Bleisalz befreite Filtrat dieser Fällung mehrfach mit Chloroform unter Zusatz von Alkohol extrahiert, wobei das Volumenverhältnis Wasser-Alkohol-Chloroform 2 : 1 : 2 betrug. Dabei ging das Rhodomycin in die Chloroform-Phase und wurde anschließend als rotes Pikrat ausgefällt. Es hatte die gleiche antibiotische Wirksamkeit wie das aus Mycel gewonnene Pikrat. Auch in den sonstigen Eigenschaften haben wir bisher keine Unterschiede zwischen den beiden Präparaten gefunden.

Trotz vieler Bemühungen ist es noch nicht gelungen, das Rhodomycin-pikrat zur Kristallisation zu bringen. Ebenso wenig Erfolg hatten wir mit dem Pikrolonat und Styphnat.

Rhodomycinsalze von Mineralsäuren lassen sich aus der gesättigten acetonischen Lösung des Pikrates durch Zugabe der betreffenden Säure gewinnen. Chlorid, Bromid, Jodid, Nitrat, Sulfat und Phosphat fallen dabei als rote Niederschläge aus. Im Gegensatz zum Pikrat und Pikrolonat sind diese, ebenfalls nur amorph erhaltenen Salze in Wasser mehr oder weniger löslich.

Das einzige bisher kristallisiert erhaltene Derivat des Antibioticums ist das Perchlorat. Es fällt als roter Niederschlag aus, wenn die gesättigte wäßrige Lösung des Rhodomycinchlorids mit einer konz. wäßrigen Natriumperchlorat-Lösung versetzt wird. Aus verd. Methanol läßt sich das Salz in mikroskopisch kleinen, roten Nadelchen erhalten, die bei 198° unscharf unter Zersetzung schmelzen. Es enthält weder Schwefel noch Methoxygruppen. Seine Analysenzahlen passen auf die Bruttoformel $C_{22}H_{30}O_{11}NCl$. Bei der katalytischen Hydrierung des Perchlorates in Methanol mit Platinkatalysator zeigte die Kurve der Wasserstoffaufnahme nach anfangs steilem Anstieg einen scharfen Knick. Nimmt man an, daß der bis zu diesem Knick aufgenommene Wasserstoff zur Hydrierung einer Chinongruppierung verbraucht wird, so errechnet sich aus seiner Menge für das Perchlorat das Mol.-Gewicht 528, ein Wert, der lediglich mit dem für obige Formel berechneten Mol.-Gewicht 519 übereinstimmt. Für Rhodomycin würde demnach die Formel $C_{22}H_{28}O_7N$ in Frage kommen. Sie kann auf Grund der weiter unten angeführten Befunde über die Uneinheitlichkeit des Rhodomycins vorläufig nur als Näherungsformel angesehen werden.

Rhodomycin selbst läßt sich aus der auf pH 8.5 eingestellten wäßrigen Lösung des Perchlorates oder seiner anderen wasserlöslichen Salze am einfachsten durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat oder etwas umständlicher durch Extraktion mit Butanol oder Benzol gewinnen. Wir erhielten es als dunkelrotes Pulver, um dessen Kristallisation wir uns bisher vergeblich bemüht haben. Gegen *St. aureus* waren die besten Präparate bis zur Verdünnung $1 : 7 \times 10^7$ wirksam. Die rote Benzollösung zeigte unscharfe Absorptionsbanden mit Maxima bei 575, 542, 535, 504 $m\mu$. Von Alkali wird das Antibioticum mit blauvioletter Farbe aufgenommen. Kurzes Erwärmen der alkalischen Lösung zerstört die antibiotische Wirksamkeit. Bei der Verteilung des Rhodomycins zwischen Benzol und Pufferlösungen von verschiedenem pH ist der Verteilungskoeffizient Benzol/Wasser bei pH 8.5, dem isoelektrischen Punkt des Farbstoffes, am größten.

II.) Der Säureabbau des Rhodomycins

Da aus Rhodomycin, wie oben erwähnt, schon bei kurzer Säureeinwirkung ein wasserunlösliches, rotes Abbauprodukt entsteht, schien es das Gegebene, die Konstitutionsermittlung des Antibioticums mit dem Studium dieses Spaltstückes zu beginnen. Man erhält es am bequemsten durch kurzes Kochen von Rhodomycin-chlorid oder -phosphat mit $2\ n\ HCl$. Es fällt als gelbroter, stickstoffreier Niederschlag aus, dessen Menge etwa 30% des eingesetzten Rhodomycins beträgt. Die stickstoffhaltige Gruppe des Rhodomycins verbleibt in Form noch unbekannter Abbauprodukte im farblosen, antibiotisch unwirksamen Filtrat des Niederschlages

Der rote Niederschlag besteht, wie seine chromatographische Untersuchung ergeben hat, aus mehreren farbigen Komponenten. Sie bilden bei der chromatographischen Adsorption an Calciumsulfat eine am oberen Rand der Adsorptionssäule haftende rote Zone 1, eine darunter befindliche gelbrote Zone 2 und zwei noch tiefer liegende, sehr wenig Substanz enthaltende und daher noch nicht näher untersuchte orangefarbene Zonen.

Das Eluat der roten Zone 1 hinterließ einen dunkelroten Rückstand, dessen rote Ätherlösung gelb fluorescierte und charakteristische, scharfe Absorptionsbanden zeigte. Beim Durchschütteln der Ätherlösung mit $2\ n\ NaOH$ farbte sich diese rein blau. Von Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde der Farbstoff nicht aufgenommen.

Der Verdampfungsrückstand des Eluates der Zone 2 kristallisierte aus verd. Methanol in gelbroten, rechteckigen Blättchen, die unscharf gegen 217° schmolzen. Beim Erhitzen über den Schmelzpunkt bildete sich eine Verbindung, deren Absorptionsbanden langwelliger sind als die des Ausgangsproduktes.

Die gelbrote Ätherlösung des kristallisierten Abbauproduktes zeigt starke gelbe Fluoreszenz. Ihre Absorptionsbanden sind kurzwelliger und unschärfer als die des roten Produktes aus Zone 1. Aus der Ätherlösung nimmt Natronlauge das Abbauprodukt mit violetter Farbe auf, an Natriumhydrogencarbonat dagegen wird nichts abgegeben.

Die ersten kristallisierten Präparate des gelbroten Abbauproduktes gaben Analysenzahlen, die gut auf die Formel $C_{15}H_{14}O_6$ passen⁴⁾. Bei der katalytischen Hydrierung zeigte die Kurve der Wasserstoffaufnahme ebenso wie beim Rhodomycin nach anfangs steilem Anstieg einen ausgeprägten Knick. Berechnet man in gleicher Weise, wie es oben für Rhodomycin angegeben ist, aus der bis zum Knickpunkt aufgenommenen Wasserstoffmenge das Mol.-Gewicht, so erhält man Werte, die gut auf die Formel $C_{15}H_{14}O_6$ stimmen.

Inzwischen haben B. Franck und H. Patt in unserem Institut die Trennung des gelbroten und roten Abbauproduktes verbessert und deren Untersuchung weitergeführt. Von ihren Ergebnissen, über die in der nächsten Mitteilung berichtet wird, sollen nur folgende hier schon Erwähnung finden. Bei der erneuten Analyse sorgfältig gereinigter Proben des gelbroten Abbauproduktes haben sich Werte ergeben, die besser auf die Formel $C_{16}H_{16}O_6$ passen, doch möchten wir die endgültige Festlegung der Bruttoformel noch zurückstellen. Ferner hat sich gezeigt, daß das Abbauprodukt keine Methoxygruppen enthält und bei der Chromsäureoxydation nach Kuhn-Roth annähernd 1 Mol. Säure liefert, die anscheinend keine reine Essigsäure ist.

Seinem Verhalten nach könnte das Abbauprodukt ein Oxyanthrachinon- oder ein Oxynaphthochinon-Derivat sein. Für ein Oxyanthrachinon-Derivat – sofern es nicht partiell hydriert ist – liegt der gefundene Wasserstoffwert etwas zu hoch. Auch spricht gegen das Vorliegen eines Anthrachinon-Derivates, daß bei der Zinkstaubdestillation des Abbauproduktes keine Anhaltspunkte für die Bildung von Anthracen-Derivaten gefunden wurden.

Naheliegender scheint es uns daher, auf Grund der bisher vorliegenden Befunde das Abbauprodukt als Naphthochinon-Derivat anzusehen. Seine blauviolette Farbe in Alkalilauge und konz. Schwefelsäure, die starke Farbaufhellung beim Acetylieren und schließlich der mit dem Auftreten einer starken roten Fluoreszenz verbundene Farbumschlag von Gelb nach Violett beim Erwärmen seiner Acetanhydrid-Lösung mit Pyroboracetat können als Beweis dafür angesehen werden, daß zwei OH-Gruppen in Nachbarstellung zum Chinonsauerstoff stehen. Das gelbrote Abbauprodukt wäre demnach, falls es sich vom Naphthochinon ableitet, ein Derivat des Naphthazarins (5,8-Dioxy-naphthochinon-(1.4)), so wie das Alkannin⁶⁾, das Javanicin⁷⁾ und das neuerdings aus Fusarien isolierte Fusarubin⁸⁾. Mit den beiden letztgenannten Naphthazarin-Derivaten stimmt unser Produkt in der Größe der Wachstumshemmung von *St. aureus* überein. Dem Fusarubin ähnelt es sehr in der Lage der Absorptionsbanden, unterscheidet sich von ihm jedoch durch das Fehlen der Methoxygruppe und dadurch, daß es in Lösung im Gegensatz zum Fusarubin eine starke, gelbe Fluoreszenz zeigt. Eine gewisse Ähnlichkeit unseres gelbroten Produktes mit Fusarubin und Alkannin besteht darin, daß es beim Erhitzen über den Schmelzpunkt und ebenso beim Kochen mit konz. alkoholischer Salzsäure in eine Verbindung übergeht, die langwelligere Absorptionsbanden hat als das Ausgangsmaterial. Auch das rote Rhodomycin-Abbauprodukt aus Zone I wandelt sich beim Erhitzen in eine Verbindung um, deren Absorptionsbanden gegenüber denen des Ausgangsproduktes nach Rot verschoben sind. Die Untersuchung dieser Umwandlungsprodukte wird sicher einen Einblick in die Konstitution der roten Spaltprodukte ermöglichen, deren endgültige Aufklärung auf den gleichen Wegen zu erreichen sein dürfte, wie die des Alkannins und Fusarubins.

III.) Gegenstromverteilung des Rhodomycins

Daß beim Salzsäure-Abbau des Rhodomycins mehrere farbige Abbauprodukte entstehen, kann folgende Gründe haben: 1.) Einsetzen der Hydrolyse an verschiedenen Stellen des Rhodomycinmoleküls, 2.) sekundäre Umwandlung eines zunächst einheitlichen Abbauproduktes, 3.) Uneinheitlichkeit des Ausgangsmaterials.

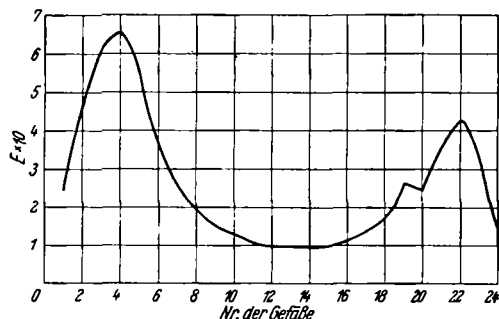
Da wir unsere Abbauprobe mit amorphen Rhodomycin-Präparaten durchgeführt haben, war es naheliegend, den Grund für das Auftreten mehrerer farbiger Spaltstücke in der Uneinheitlichkeit des Ausgangsmaterials zu

⁶⁾ H. Brockmann, A. 521, 24 [1935].

⁷⁾ H. R. V. Arnstein u. A. H. Cook, Journ. chem. Soc. London 1947, 1921.

⁸⁾ H. W. Ruelius u. A. Gauhe, A. 569, 38 [1950].

suchen. Um unser Rhodomycin in dieser Hinsicht zu prüfen, verwendeten wir die fraktionierte Gegenstromverteilung, ein Verfahren, das sich für diesen Zweck geeigneter erwies als die chromatographische Adsorption. Als nicht-wäßrige Phase diente dabei Butanol. Wie Vorversuche ergaben, erreicht man den für die Trennung günstigsten Wert 1 für den Verteilungskoeffizienten, wenn als wäßrige Phase eine Pufferlösung vom pH 7.2 angewandt wird. Die Abbildung zeigt die Kurve einer in diesem System über 24 Stufen durchgeführten Verteilung des Rhodomycins, bei der die von N. Grubhofer⁹⁾ entwickelte



Abbild. Verteilungskurve eines Rhodomycin-Präparates zwischen Butanol und $m/10$ Phosphat-Puffer vom pH 7.2

Apparatur verwendet wurde. Auf der Ordinate sind — ausgedrückt in der stufenphotometrisch gemessenen Extinktion — die Farbstoffkonzentrationen in den einzelnen Gefäßen aufgetragen. Die beiden weit auseinander liegenden Maxima zeigen, daß das eingesetzte Rhodomycin aus zwei Fraktionen besteht. Die in den Gefäßen 1–6 verbliebene befand sich vorwiegend in der wäßrigen Phase und ist im folgenden als Rhodomycin A

bezeichnet. Die andere in den Gefäßen 18–24 vorwiegend in der Butanolphase vorliegende Fraktion, deren Menge etwa halb so groß war wie die von A, bezeichnen wir vorläufig als Rhodomycin B. Beide Fraktionen waren gegen *St. aureus* bis zur Verdünnung $1 : 4 \times 10^7$ wirksam, und beide erwiesen sich als optisch aktiv. Für das Pikrat der Fraktion A wurde gefunden: $[\alpha]_{600-780}^{24} : +181^\circ \pm 24^\circ$, für das der Fraktion B $[\alpha]_{600-780}^{24} : +109^\circ \pm 10^\circ$. Die unsymmetrische Verteilungskurve der Fraktion B zeigt, daß diese offenbar noch nicht einheitlich ist. Das aus dem Mycel gewonnene Rhodomycin verhielt sich bei der Verteilung ebenso wie das aus der Kulturflüssigkeit gewonnene. Statt der Phosphat-Pufferlösung vom pH 7.2 haben wir in einem Versuch auch eine Borax-Kaliumdihydrogenphosphat-Pufferlösung vom pH 7.6 verwendet. Der Verteilungskoeffizient, der hier bei etwa 1.4 lag, wurde durch Zugabe von Cyclohexan auf 1 herabgesetzt.

Von Interesse ist, ob sich die beiden Rhodomycin-Fraktionen in der Konstitution ihrer Farbstoffkomponenten unterscheiden. Orientierende Versuche haben ergeben, daß bei der Säurehydrolyse von Rhodomycin A überwiegend der rote, langwellig absorbierende Farbstoff entsteht, während beim Abbau von Rhodomycin B neben dem roten Farbstoff die gelbrote, kristallisierte Fraktion auftritt. Eine der nächsten Aufgaben wird sein, von beiden Rhodomycin-Fraktionen kristallisierte Derivate herzustellen, sie näher zu charakterisieren und zu ermitteln, in welchem Mengenverhältnis bei ihrem Abbau das rote und das gelbrote Abbauprodukt gebildet wird. Erst nach Klärung dieser Frage kann entschieden werden, ob in den Fraktionen A und B einheitliche chemische Verbindungen vorliegen.

⁹⁾ Chem.-Ing.-Technik 22, 209 [1950].

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und dem Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer, insbesondere Hrn. Dr. Auhagen und Hrn. Dr. Bohne, danken wir dafür, daß sie die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Beschreibung der Versuche

Kulturbedingungen des Streptomyces-Stammes: Der aus Waldboden der Umgebung Göttingens isolierte Stamm *Streptomyces purpurascens*, nov. spec., wurde zunächst auf Schräg-Agar-Röhrchen kultiviert. Zur Gewinnung von Impfmateriale wurden Vorkulturen in 200 ccm-Erlenmeyer Kolbchen auf der gleichen Nährlösung wie bei den Großversuchen angelegt. Die nach 6–8 tägigem Wachstum bei 25–30° gebildeten Sporen wurden zusammen mit der Kulturflüssigkeit zum Beimpfen der in P-Kolben bei 130° sterilisierten Nährlösung verwendet, die folgende Zusammensetzung hatte: 2% Glycerin, 0.05% Glykokoll, 0.1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0.2% Natriumchlorid, 0.005% Magnesiumsulfat, 0.001% Eisen(II)-sulfat, 0.01% Calciumcarbonat und 2% ungehopfte Bierwürze¹⁰⁾, gelöst in Leitungswasser. Das pH der Nährlösung war vor dem Sterilisieren 6.8–7.0.

Bei einer Bruttemperatur von 25–30° zeigten sich 6–8 Tage nach der Beimpfung der P-Kolben kleine weiße, an der Unterseite rot gefärbte Kolonien. Gleichzeitig wurde roter Farbstoff an die Nährlösung abgegeben. Am 12. Tage nach der Beimpfung war die Kulturflüssigkeit gegen *St. aureus* bis zur Verdünnung 1:500 wirksam, am 18. bis 20. Tage bis zur Verdünnung 1:2000 und in manchen Ansätzen bis 1:5000. Bei längerer Kultur nahm die Wirksamkeit wieder ab.

Die Bestimmung der antibiotischen Wirksamkeit erfolgte im Verdünnungstest gegen *St. aureus*. Die Verdünnung (1g Subst. in a ccm Wasser), bis zu der nach Ablauf von 24 Stdn. noch eine Wachstumshemmung zu beobachten war (das Teströhrchen war im Gegensatz zur Kontrolle vollkommen klar), ist im folgenden als Maß der Wirksamkeit (abgekürzt „W.“) angegeben. Die Durchführung der Teste verdanken wir Frln. I. Olfermann.

In einer größeren Versuchsreihe wurde die Zusammensetzung der Nährlösung in bezug auf die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, sowie auf Zusätze variiert, während die Salz-mengen die gleichen blieben, wie oben angegeben. Die Tafel 1 (S. 708) zeigt die zu verschiedenen Zeiten gefundene Wirksamkeit verschiedener Nährlösungen.

Gewinnung von Rhodomycin-Konzentrat aus der Kulturlösung: 10 l einer vom Mycel abfiltrierten Kulturlösung (W. 1:1000) wurden bis zur Entfärbung der wäßr. Phase mit Butylacetat durchgeschüttelt, wonach die wäßr. Phase noch W. 1:20 zeigte. Die rote Butylacetatlösung hinterließ beim Verdampfen i. Vak. ein rotes Öl (2 g mit W. 1:800000), das mit Benzol digeriert wurde. Ein Teil blieb ungelöst, wurde fest und bildete getrocknet ein rotes Pulver (0.12 g, W. 1:10⁷). Der ölige Rückstand des Benzolauszuges hatte W. 1:100000.

Beim Behandeln des roten Pulvers mit Tetrahydrofuran ging ein Teil mit roter Farbe in Lösung. 32 mg mit W. 1:4 × 10⁷ blieben ungelöst zurück. Diese Fraktion war weitgehend angereichertes Rhodomycin. Beim Verdampfen des Tetrahydrofuranextraktes hinterblieb ein ölicher Rückstand mit W. 1:60000.

Darstellung von Rhodomycin-pikrat. 1.) Aus dem Mycel: 4.2 kg lufttrockenes Mycel wurden zur Zertrümmerung der Zellen in Aceton suspendiert, einige Zeit bei –50° gehalten, dann abfiltriert und nach dem Trocknen in der Kugelmühle fein zermahlen. Das so erhaltene hellrote Pulver wurde mehrmals mit insgesamt 20 l 80-proz. Acetons (enthaltend 2% Schwefelsäure) kalt extrahiert und abgepreßt. Die dunkelrote Lösung brachte man durch Zugabe von Natriumcarbonat auf pH 6.5, filtrierte vom ausgefallenen Natriumsulfat ab und versetzte mit 20 l peroxydfreiem Äther. Nach Durchschütteln enthielt die untere wäßr.-acetonische Phase (etwa 5 l) den gesamten wirksamen Farbstoff, die Ätherschicht dagegen unwirksame Begleitfarbstoffe und Fette. Zur wäßr.-acetonischen Phase gab man anteilweise eine konz. methanol. Lösung von bas. Bleiacetat, bis nichts mehr ausfiel, filtrierte und fällte aus dem Filtrat überschüss. Bleisalz mit Natriumhydrogencarbonat. Nachdem mit Natriumcarbonat auf pH 8.6–9 eingestellt war (die rote Farbe der Lösung schlug dabei nach Violett um), wurde der Farbstoff mit Butanol aus-

¹⁰⁾ Die Bierwürze verdanken wir der Städtischen Brauerei in Göttingen.

Tafel 1. Wirksamkeit verschiedener Nährlösungen nach verschiedenen Zeiten

Nährlösung (Kohlenstoff- u. Stickstoff-haltige Bestandteile u. besondere Zusätze)	Alter der Kultur in Tagen	Wachstum	Wirksamkeit der Kulturlösung gegen <i>Staph. aureus</i>
Glycerin/Kaliumnitrat	16		1 : 100
	22	mäßig	1 : 500
	30		unwirksam
Glycerin/Kaliumnitrat + Hefekochsaft .	16		unwirksam
	23	schlecht	1 : 500
	30		1 : 200
Glycerin/Glykokoll	16		1 : 500
	22	mäßig	1 : 1000
Glycerin/Glykokoll + Hefekochsaft ...	23		1 : 200
	30	schlecht	unwirksam
Glycerin/Natriumnitrat, Bierwürze + Mycelhydrolysat	16		1 : 500
	22	gut	1 : 2000
	30		unwirksam
Glycerin/Glykokoll, Probacit	16		1 : 100
	22	mäßig	1 : 200
	30		1 : 1000
Milchzucker/Natriumnitrat	16		1 : 100
	23	mäßig	1 : 500
	30		unwirksam
Glucose/Glykokoll	16		1 : 500
	22	gut	1 : 2000
	30		1 : 500
Glucose/Pepton/Probacit	16		unwirksam
	23	schlecht	1 : 50
	30		1 : 200

geschüttelt. Aus der mit konz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschenen und mit dem gleichen Vol. Äther verdünnten Butanolphase ließ sich das Rhodomycin quantitativ mit 10-proz. Essigsäure ausziehen. Aus dieser Lösung entfernte man zunächst durch Ausschütteln mit Äther das Butanol, vertrieb den Äther i. Vak. und versetzte sie dann mit einer konz. wäbr. Pikrinsäure-Lösung. Es fielen 9 g hellrotes, amorphes Rhodomycin-pikrat mit W. 1 : 5×10^7 aus.

Das Pikrat ist leicht löslich in Aceton und Eisessig, schwerer löslich in den niedermolekularen Alkoholen und unlöslich in Äther, Benzol, Petroläther und Wasser.

2.) Aus der Kulturlösung¹¹⁾: 350 l vom Mycel abfiltrierte Kulturlösung wurden i. Vak. auf 7 l eingengt, auf pH 8.6 eingestellt und mit Ammoniumsulfat gesättigt. Die entstandene Fällung, die das gesamte Antibioticum enthielt, wurde abzentrifugiert, mit konz. Ammoniumsulfat-Lösung gewaschen, abermals zentrifugiert und in feuchtem Zustand anteilweise mit insgesamt 12.5 l Aceton extrahiert. Den dunkelroten Auszug engte man i. Vak. auf 1.4 l ein. Nach Zugabe von 3 l dest. Wasser und Ansäuern mit Essigsäure bis zum pH 3.0 konnten durch erschöpfendes Ausäthern schwach wirksame Begleitstoffe und geringe Mengen Fett entfernt werden. Die wäbr. Phase wurde nun, wie oben beschrieben, nach Einstellen auf pH 9.0 mit bas. Bleiacetat behandelt. Das vom überschüss. Bleisalz befreite Filtrat (W. 1 : 100000) wurde mit Chloroform und Alkohol aus-

¹¹⁾ Mitbearb. von Dipl.-Chem. B. Franck.

geschüttelt, wobei Wasser, Alkohol und Chloroform im Verhältnis 2:1:2 vorhanden waren. Dabei suchte das Antibioticum die untere, hydrophobe Phase auf, während die wäßr.-alkohol. obere Phase fast unwirksam war. Die Chloroform-Phase wurde i. Vak. auf 250 ccm eingengt, mit Wasser verdünnt und nachdem mit Essigsäure schwach angesäuert war, mit einer konz. wäßr. Pikrinsäure-Lösung versetzt. Es fielen 7.9 g dunkelrotes Pikrat ($W. 1:4 \times 10^7$) aus, das in seinen Löslichkeitseigenschaften dem aus Mycel gewonnenen Pikrat gleich war.

Rhodomycin-phosphat: Eine gesätt. Lösung von 330 mg Rhodomycin-pikrat in Aceton wurde unter Kühlung tropfenweise mit konz. Phosphorsäure versetzt, bis nichts mehr ausfiel. Das amorphe, hellrote Phosphat wurde abgesaugt und mit Aceton und Äther gewaschen; Ausb. 206 mg, $W. 1:8 \times 10^7$. Das Phosphat ist löslich in Wasser, Methanol und Äthanol, unlöslich in Aceton, Äther und Petroläther.

In analoger Weise können aus dem Pikrat das Hydrochlorid, Hydrobromid, Hydrojodid, Sulfat und Nitrat des Rhodomycins hergestellt werden. Rhodomycin-hydrojodid ist in Wasser nur mäßig löslich.

Zerlegung des Rhodomycin-pikrates an gesäuertem Aluminiumoxyd: Eine gesätt. Lösung von 330 mg Rhodomycin-pikrat in Aceton wurde durch eine Säule von Aluminiumoxyd filtriert, das mit Salzsäure vorbehandelt und dann getrocknet war. Im gelben Filtrat befand sich die Pikrinsäure, während das Rhodomycin auch beim Nachwaschen mit Aceton am oberen Rand der Säule eine violett-rote Zone bildete, die mit Methanol eluiert werden konnte. Eine erst mit salzsaurem Methanol eluierbare schwache Restzone wurde verworfen. Aus dem Methanoleluat der Rhodomycinzone wurde das Rhodomycin-hydrochlorid mit Äther ausgefällt; Ausb. 150 mg, $W. 1:9 \times 10^7$.

Rhodomycin-perchlorat: In der eben beschriebenen Weise wurden 990 mg Rhodomycin-pikrat in das Hydrochlorid übergeführt. Aus dessen konz. wäßr. Lösung fiel auf Zugabe einer gesätt. wäßr. Natriumperchlorat-Lösung Rhodomycin-perchlorat aus, das abzentrifugiert und mit wenig Wasser gewaschen wurde. Nach Lösen in Aceton und Verdünnen mit Wasser kristallisierte nach einigen Tagen das Perchlorat in mikroskopisch kleinen Nadelbüscheln aus; Ausb. 320 mg. Es ist löslich in Aceton, Methanol und Äthanol, ziemlich schwer löslich in Wasser; Schmp. 198° (Zers.).

$C_{22}H_{29}O_7N \cdot HClO_4$ (519.9) Ber. C 50.82 H 5.81 N 2.69 Cl 6.82

Gef. C 50.30 H 6.04 N 2.25 Cl 6.82

Katalytische Hydrierung: 22.5 mg Perchlorat wurden in Methanol mit 33.7 mg Platinoxid (vorher aushydriert) in einer Mikroapparatur hydriert. Nach Verbrauch von 1.06 ccm H_2 ($0^\circ/760$ Torr) trat ein scharfer Knick in der Kurve der Wasserstoffaufnahme ein. Ein zweiter Versuch hatte ein analoges Ergebnis.

$C_{22}H_{29}O_7N \cdot HClO_4$ Ber. Mol.-Gew. 519.9 Gef. Mol.-Gew. 523, 533

Aus der hydrierten Substanz ließ sich durch Dehydrierung kein Ausgangsmaterial zurückgewinnen.

Gewinnung von Rhodomycin aus seinen Salzen: Die wäßr. Lösung des Chlorides oder Phosphates wurde mit Natriumhydrogencarbonat auf $pH\ 8.5 \pm 0.2$ eingestellt und mit Butanol oder Benzol erschöpfend ausgezogen. Beim Verdampfen des roten Auszuges i. Vak. hinterließ das Rhodomycin als dunkelrotes Pulver ($W. 1:8 \times 10^7$). Die Maxima der Absorptionsbanden lagen in Benzol bei 575, 542, 535 und 504 $m\mu$. Die rote, wäßr. Lösung wurde auf Zusatz von 0.1 n NaOH blau und zeigte Banden bei 618 und 574 $m\mu$.

Tafel 2. E-Werte in Abhängigkeit vom pH der Puffer-Lösung

pH	7.54	7.92	8.14	8.37	8.48	8.60	8.70	9.21
E	0.18	0.26	0.35	0.42	0.44	0.43	0.40	0.37

Verteilungsversuche: Von einer 0.1-proz. wäßr. Rhodomycin-Lösung wurden jeweils 1 ccm mit 5 ccm $m/10$ Borax-Salzsäure-Puffer gemischt, dessen pH mit dem Ionometer kontrolliert war. Dann wurde mit 6 ccm Benzol bis zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes geschüttelt und der Rhodomycin-Gehalt der Benzol-Schicht mit dem Stufenphotometer gemessen. In der Tafel 2 sind die gefundenen E-Werte in Abhängigkeit vom pH der Puffer-Lösung angegeben.

Die Rhodomycin-Konzentration der Benzollösung ist also am größten, wenn die Puffer-Lösung p_H Werte hat, die in der Nähe von 8.5 liegen.

Gegenstromverteilung des Rhodomycins: 200 mg Rhodomycin ($W. 1:5 \times 10^7$) wurden in der von N. Grubhofer⁹⁾ angegebenen Apparatur einer fraktionierten Gegenstromverteilung zwischen Butanol und $m/_{10}$ Borax-Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer vom p_H 7.6 unterworfen. Dem Butanol war so viel Cyclohexan zugesetzt, daß der Verteilungskoeffizient 1 war. Bei einer Verteilung über 24 Stufen zeigte die Verteilungskurve zwei gut voneinander getrennte Maxima. Die Fraktionen des ersten Maximums blieben vorwiegend in der Puffer-Lösung der Gefäße 3–6 (Rhodomycin A), die des zweiten Maximums (Rhodomycin B) befanden sich vorzugsweise in den Butanolphasen der Gefäße 20–24. Eine colorimetrische Bestimmung ergab, daß die Menge des Rhodomycins A etwa doppelt so groß war wie die des Rhodomycins B. Die aus beiden Fraktionen gewonnenen Pikrate hatten $W. 1:2 \times 10^7$.

1.15 g Rhodomycin-phosphat ($W. 1:15 \times 10^6$) wurden in einer Verteilungsapparatur nach Grubhofer, die je Stufe ein Fassungsvermögen von 800 ccm (400 ccm für jede Phase) hat, zwischen Butanol und $m/_{10}$ Phosphat-Puffer vom p_H 7.2 über 20 Stufen verteilt. Maximum 1 (Rhodomycin A) lag zwischen Stufe 1 und 8, Maximum 2 (Rhodomycin B) zwischen Stufe 13 und 20. Die Lösungen der Stufen 9–12 waren nur schwach gefärbt und wurden verworfen.

Der Inhalt der Gefäße 1–8 wurde vereinigt, die wäßr. Phase auf p_H 8.5 eingestellt und der Farbstoff quantitativ in das Butanol überführt. Die mit wenig Wasser durchgeschüttelte Butanollösung engte man i. Vak. ein, verdünnte mit dem gleichen Vol. Äther und schüttelte das Rhodomycin mit 10-proz. Essigsäure aus. Auf Zusatz einer konz. wäßr. Pikrinsäure-Lösung fielen aus der essigsauren Lösung 525 mg Pikrat ($W. 1:15 \times 10^6$). Aus dem in gleicher Weise aufgearbeiteten Inhalt der Gefäße 13–20 wurden 220 mg Pikrat ($W. 1:20 \times 10^6$) gewonnen.

200 mg Rhodomycin-phosphat wurden in der gleichen Apparatur über 24 Stufen zwischen Butanol und $m/_{10}$ Phosphat-Puffer vom p_H 7.2 verteilt. In jeder Stufe wurde der Farbstoff, nach Einstellen der Puffer-Lösung auf p_H 8.5 quantitativ in das Butanol überführt. Nachdem die so erhaltenen 24 Butanollösungen auf das gleiche Volumen aufgefüllt waren, wurde in jeder der Farbstoffgehalt stufenphotometrisch ermittelt. Die für die Schichtdicke 1 cm mit dem Filter S 53 ermittelten Werte für E sind in der in der Abbildung auf S. 706 wiedergegebenen Verteilungskurve als Ordinate aufgetragen.

Abbau des Rhodomycins mit Salzsäure: Eine gesätt. Lösung von 1 g Rhodomycin-pikrat in Aceton wurde mit 50 ccm $nHCl$ versetzt. Nach Ausäthern der Pikrinsäure erhitzte man die saure wäßr. Rhodomycin-Lösung 5 Min. zum Sieden, wobei gelbrote Flocken ausfielen, die getrocknet 280 mg wogen ($W. 1:300000$).

Fraktionierung des roten Abbauproduktes: Eine Lösung von 150 mg des roten Abbauproduktes in einer Mischung von 7 Vol. Chloroform und 3 Vol. Benzol wurde unter Überdruck durch eine Säule von staubfein gemahlenem, auf 180° erhitztem Naturgips filtriert. Beim Entwickeln des Chromatogrammes mit einer Mischung von 6 Vol. Chloroform, 3 Vol. Benzol und 1 Vol. Aceton bildeten sich zwei Hauptzonen aus, von denen die obere rötlich, die darunter liegende gelbrot gefärbt war. Das Eluat der gelbroten Zone hinterließ beim Verdampfen i. Vak. einen Rückstand, der aus verd. Methanol in gelbroten Blättchen kristallisierte. Bei raschem Erhitzen schmolzen sie unscharf gegen 217° . In Methanol, Äther und Benzol ist die Fraktion mit gelbroter Farbe und gelber Fluorescenz löslich. Die Maxima der Absorptionsbanden in Äther lagen bei 582, 518, 496, (463), (431) $m\mu$. In Petroläther war das Abbauprodukt fast unlöslich.

$C_{15}H_{14}O_6$ (290.3) Ber. C 62.06 H 4.86 Gef. C 62.28 H 5.00

Der Verdampfungsrückstand der roten Chromatogrammzone löste sich in Äther und Methanol karmoisinrot mit gelber Fluorescenz. Die Absorptionsbanden in Äther waren schärfer als die der gelben Fraktion. Die Maxima lagen bei 565, 530, 526, 514, 486 $m\mu$.