

Der *Keto-trans-tetramethylester XIX* β kristallisiert nach dem Umlösen aus Methanol zuerst in farblosen feinen Nadeln, die nach kurzer Zeit in dimorphe prismatische Plättchen übergehen. Er schmilzt bei 198–199° und gibt im Gemisch mit dem *cis*-Tetramethylester (entspr. V A) vom Schmp. 201–202° eine starke Schmp.-Depression.

$C_{40}H_{38}O_{10}$ (678.7) Ber. C 70.78 H 5.64 OCH_3 22.86
Gef. C 70.70, 70.98 H 5.73, 5.65 OCH_3 22.74, 23.01

Die beiden *Keto-trans-tetramethylester XIX* α und β fallen etwa im Verhältnis 1:1 an.

b) 3 g *cis-Tetramethylester entspr. V B* vom Schmp. 222–223° werden wie oben mit Na-Methylatlösung unter Rückfluß gekocht. Die Aufarbeitung und anschließende Veresterung liefert hier ebenfalls die beiden *Keto-trans-tetramethylester XIX* α und β .

HANS BROCKMANN und REIMER CÖLLN

Geomycin IV¹⁾; Antibiotica aus Actinomyceten, XLII²⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 22. September 1958)

Im Geomycin sind vier β -Lysin-Reste über ihre ϵ -Aminogruppe säureamidartig miteinander verbunden. Geamin wird bereits unter sehr milden Bedingungen hydrolytisch abgespalten und ist wahrscheinlich über seine Hydroxygruppe mit dem Teil der Geomycin-Molekel verknüpft, der bei Partialhydrolyse reduzierende Abbauprodukte liefert und wahrscheinlich Zucker- bzw. Aminosucker enthält.

Geomycin ist ein basisches, wasserlösliches, gegen grampositive und gramnegative Bakterien wirksames, nephrotoxisches Antibioticum, das papierchromatographisch in die Geomycine A, B und C zerlegt werden konnte³⁾. In seinem Totalhydrolysat fanden sich¹⁾: β -Lysin (I), Geamin (II), Ammoniak, Kohlendioxyd und in sehr geringer Menge Substanzen mit den R_F -Werten von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Glycin und Alanin.

Im folgenden berichten wir über Versuche, durch saure Partialhydrolyse zu neuen Abbauprodukten des Geomycins zu kommen. Da diese Versuche zunächst nur orientierenden Charakter hatten, führten wir sie mit einem über das Pikrat gereinigten Geomycin-hydrochlorid durch, ohne zu versuchen, dieses vorher in die Komponenten A, B und C zu zerlegen.

Ausgangspunkt unserer Arbeit war die Beobachtung¹⁾, daß bei kurzem Kochen des Geomycins mit 20-proz. Salzsäure drei, im folgenden als S_0 , S_1 und S_2 bezeichnete,

¹⁾ III. Mitteil.: H. BROCKMANN und H. MUSSO, Chem. Ber. **88**, 648 [1955].

²⁾ XLI. Mitteil.: H. BROCKMANN, H. GRÖNE und G. PAMPUS, Chem. Ber. **91**, 1916 [1958].

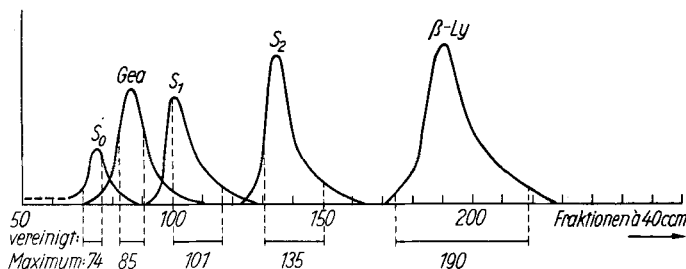
³⁾ H. BROCKMANN und H. MUSSO, Chem. Ber. **87**, 1779 [1954].

ninhydrinpositive Abbauprodukte mit kleineren R_F -Werten als β -Lysin entstehen, die im weiteren Verlauf der Hydrolyse wieder verschwinden. Um zu sehen, ob diese Spaltprodukte, wie vermutet¹⁾, β -Lysinpeptide sind, wurde versucht, sie in größerer Menge darzustellen.

ABBAU DES GEOMYCINS ZU β -LYSINPEPTIDEN

Vorversuche, bei denen wir verschieden durchgeführte Salzsäure-Partialhydrolysen papierchromatographisch verfolgten, ergaben, daß die Zonen von S_0 , S_1 und S_2 nach 25 Min. langem Kochen des Geomycins mit 20-proz. Salzsäure am stärksten waren. Der naheliegende Versuch, auch die präparative Trennung papierchromatographisch durchzuführen und dafür das früher beschriebene Papierpack-Verfahren⁴⁾ zu verwenden, verliefen unbefriedigend. Die Zonen lagen nicht weit genug auseinander, um ein sauberes Ausschneiden an Hand von Leitchromatogrammen zu gestatten.

Erfolg hatten wir dagegen mit dem basischen Ionenaustauscher Dowex 1 X 8, von dem die Abbauprodukte S_0 , S_1 , S_2 , sowie Geamin und β -Lysin mit 0.6 n NH_3 fraktionierte eluiert werden konnten. Die Zonen von S_0 , S_1 , S_2 und β -Lysin hatten an der Austauscher-Säule (Abbild. 1) die umgekehrte Reihenfolge wie im Papierchromatogramm, in dem β -Lysin am schnellsten wandert. Geamin, das zwischen S_0 und S_1 eluiert wurde, ließ sich nicht völlig von diesen trennen, was jedoch, wie unten gezeigt, nicht störte. Auf Versuche, die sirupösen, hygroskopischen Fraktionen S_0 , S_1 und S_2 zur Kristallisation zu bringen, wurde verzichtet.



Abbild. 1. Elutionsdiagramm eines Geomycin-Partialhydrolysates. OH-Form des Anionen-Austauschers Dowex 1 X 8. Elution mit 0.6 n NH_3 . Auf der Ordinate: Relative Farbintensität der Ninhydrin-Reaktion

Bei Totalhydrolyse mit 20-proz. Salzsäure (16 Std., 110°) entstand aus S_2 als einziges Abbauprodukt β -Lysin, aus S_1 und S_0 ebenfalls β -Lysin und daneben sehr wenig Geamin. Da seine Menge im Laufe der Hydrolyse nicht zunahm, handelt es sich um den geringen Geamin-Anteil, der an der Austauscher-Säule nicht quantitativ von S_0 und S_1 abzutrennen war.

Nach diesen Befunden mußten S_0 , S_1 und S_2 β -Lysinpeptide sein, und damit erhob sich die Frage, wieviel Aminosäure-Bausteine diese Peptide enthalten. Sie ließ sich auf Grund folgender Überlegungen und Versuche beantworten.

Bei Lysinpeptiden nimmt die Zahl der basischen Aminogruppen mit der Zahl der Lysinreste zu, und da die Peptide nur eine Carboxygruppe enthalten, verringert sich ihre Acidität

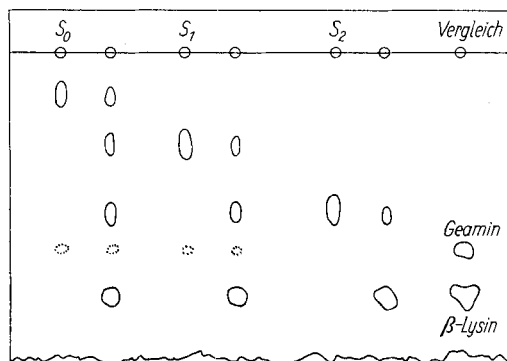
⁴⁾ H. BROCKMANN und P. PATT, Naturwissenschaften 40, 221 [1953].

mit zunehmendem Molekulargewicht. Von basischen Ionenaustauschern löst Ammoniak daher höhere Lysinpeptide leichter ab als niedere. Dem Elutionsdiagramm (Abbild. 1) unseres Partialhydrolysates nach mußte somit in den Abbauprodukten die Zahl der β -Lysinreste in der Reihenfolge S_0 , S_1 , S_2 abnehmen.

Als nächstes war zu klären, ob S_2 ein Dipeptid, Tripeptid oder ein Gemisch aus beiden ist. Wäre es Tri- β -lysin, so müßte Di- β -lysin in der β -Lysinzone enthalten sein, oder, anders ausgedrückt, Di- β -lysin würde sich von Tri- β -lysin leichter trennen als von β -Lysin. Das aber ist sehr unwahrscheinlich.

Nimmt man andererseits an, daß S_2 ein Gemisch aus Di- β -lysin und Tri- β -lysin ist, so müßten die Fraktion S_1 Tetra- β -lysin und evtl. Penta- β -lysin und die Fraktion S_0 noch höhere β -Lysinpeptide enthalten. Das aber würde bedeuten: Tri- β -lysin trennt sich von Tetra- β -lysin, nicht dagegen von Di- β -lysin, was ebenfalls sehr unwahrscheinlich ist. Man kommt somit zu dem Schluß, daß S_2 aus Di- β -lysin, S_1 aus Tri- β -lysin und S_0 aus Tetra- β -lysin besteht, wobei zunächst offenbleibt, ob S_0 neben Tetra- β -lysin noch höhere β -Lysinpeptide enthält.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Partialhydrolyse von S_0 , S_1 und S_2 , bei der ein Tetrapeptid drei Abbauprodukte (β -Lysin, Dipeptid, Tripeptid), ein Tripeptid zwei (β -Lysin, Dipeptid) und ein Dipeptid nur eines liefern sollte. Tatsächlich entstanden (Abbild. 2) aus S_0 drei Abbauprodukte mit dem gleichen R_F -Wert wie S_1 , S_2 und β -Lysin, aus S_1 zwei mit dem R_F -Wert von S_2 und β -Lysin, während S_2 nur β -Lysin gab. Damit scheint uns gesichert, daß im Geomycin mindestens vier β -Lysinreste säureamidartig miteinander verknüpft sind.



Abbild. 2. Papierchromatogramm der Fraktionen S_0 , S_1 und S_2 sowie ihrer Partialhydrolysate (jeweils rechts daneben). Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1); absteigende mobile Phase

Für Geomycin-hydrochlorid wurde als kleinste, vorläufige Formel $(C_6H_{12}N_2O_2 \cdot HCl)_8$ vorgeschlagen¹⁾. Auf sie bezogen, ergibt sich aus den bei der Totalhydrolyse des Geomycins gefundenen Ausbeuten¹⁾, daß Geomycin ein Mol. Geamin, vier Moll. β -Lysin und drei als NH_3 abspaltbare Gruppen enthält; d. h., das größte β -Lysinpeptid, das beim Abbau entstehen könnte, wäre in Übereinstimmung mit den vorstehenden Befunden ein Tetra- β -lysin.

Um zu erfahren, welche von den beiden Aminogruppen des β -Lysins an der Peptidbindung beteiligt ist, mußten S_0 , S_1 und S_2 in 2,4-Dinitrophenyl-Derivate übergeführt und deren Totalhydrolysate auf Anwesenheit von β -DNP- β -Lysin (V) und ϵ -DNP- β -

Lysin (VI) untersucht werden. Da V und VI noch nicht bekannt waren, wurde versucht, sie durch Umsetzung von β -Lysin mit einem Unterschluß an 2,4-Dinitro-fluorbenzol zu gewinnen.

Vorversuche mit Lysin hatten gezeigt, daß bei Anwendung von weniger als 2 Moll. Dinitro-fluorbenzol neben Bis-DNP-lysin die beiden isomeren Mono-DNP-lysine in etwa gleicher Menge nebeneinander auftreten. Anders verlief die Umsetzung von 2,4-Dinitro-fluorbenzol mit β -Lysin. Hier entstand ein Reaktionsprodukt, dessen Papierchromatogramm neben der Bis-DNP- β -lysin-Zone eine zweite, etwa gleich starke mit größerem R_F -Wert und daneben eine sehr schwache dritte Zone aufwies. Von den beiden zu erwartenden Mono-DNP-Derivaten V und VI war demnach eines nur in sehr geringer Menge entstanden, d. h. eine der beiden Aminogruppen des β -Lysins reagiert nur träge mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol; ein Schluß, der dadurch bestätigt wurde, daß β -Lysin auch mit mehrfachem Überschuß an 2,4-Dinitro-fluorbenzol und bei verlängerter Einwirkungsdauer nur unvollständig reagierte. In der Reaktionslösung war neben Bis-DNP- β -lysin immer noch dasjenige Mono-DNP- β -lysin nachzuweisen, das bei Anwendung eines Unterschusses an 2,4-Dinitro-fluorbenzol in größerer Menge entsteht. Das Isomere dagegen fehlte.

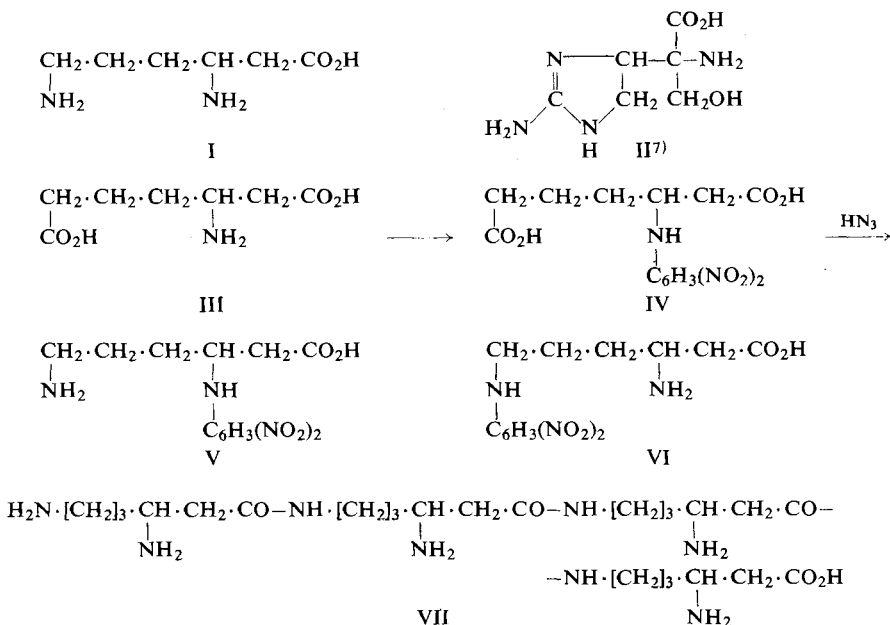
Da Lysin sich mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol glatt an beiden Aminogruppen umsetzt, war anzunehmen, daß die ϵ -Aminogruppe des β -Lysins normal reagiert und der Grund für die bevorzugte Bildung des einen Mono-DNP-Derivates in der Reaktionsträgheit der β -Aminogruppe zu suchen ist. Um diese Annahme zu beweisen, mußte festgestellt werden, welches der beiden Mono-DNP- β -lysine eine freie β - bzw. ϵ -Aminogruppe hat. Am einfachsten erschien es uns, diese Frage durch eine Synthese des β -DNP- β -Lysins zu beantworten. Wir führten sie nach dem Vorbild der β -Lysin-Synthese von L. BIRKOFER und I. STORCH⁵⁾ durch, indem wir die von diesen Autoren verwendete β -Amino-pimelinsäure (III) als 2,4-Dinitrophenyl-Derivat mit Stickstoffwasserstoffsäure umsetzten⁶⁾. Auch in III reagierte die β -Aminogruppe nur sehr träge mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol. Trotz längerer Reaktionszeit betrug die Ausbeute an IV nur 15% d. Th. Der SCHMIDTSche Abbau von IV gab in etwa 50-proz. Ausbeute β -DNP- β -Lysin (V), das dank seiner Löslichkeit in verd. Salzsäure leicht von 2,4-Dinitro-phenol und Ausgangsmaterial befreit werden konnte. V verhielt sich in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen wie dasjenige der beiden Mono-DNP- β -lysine, das beim Umsetzen von β -Lysin mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol in sehr geringer Ausbeute entsteht. Damit war gezeigt, daß dieses Produkt das β -Mono-DNP- β -lysin und das bei der gleichen Umsetzung in größerer Ausbeute entstehende das isomere ϵ -Mono-DNP- β -lysin (VI) ist.

Nachdem damit die R_F -Werte von V und VI bekannt waren, wurden die Fraktionen S_0 , S_1 und S_2 mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol behandelt. Auch hier war vollständige Umsetzung nicht zu erreichen. Selbst nach 6stdg. Einwirkung von 2,4-Dinitro-fluorbenzol (normale Einwirkungsdauer 2 Stdn.) waren noch unvollständig dinitro-phenylierte und daher in Essigester schwer lösliche Produkte im Reaktionsgemisch vorhanden. Die vollständig dinitro-phenylierten Peptide ließen sich mit Essigester aus dem angesäuerten Reaktionsgemisch extrahieren und so von unvollständig umgesetzten tren-

⁵⁾ Chem. Ber. 86, 749 [1953].

⁶⁾ R. CÖLLN, Dissertat., Göttingen 1957.

nen. Sie enthielten alle reichliche Mengen 2,4-Dinitro-phenol. Auf seine Abtrennung konnte verzichtet werden, weil es das Ergebnis der Totalhydrolyse nicht beeinflusste.



16stdg. Kochen der drei DNP-Derivate mit 20-proz. Salzsäure gab Hydrolysate, deren Papierchromatogramme drei Zonen zeigten. Ihre R_F -Werte stimmten in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen mit denen von Bis-DNP- β -lysin, β -Mono-DNP- β -lysin (V) und 2,4-Dinitro-phenol überein. Daß bei der Hydrolyse aller drei DNP-Peptide nur β -DNP- β -Lysin gebildet wird, beweist: In S_0 , S_1 und S_2 sind die β -Aminogruppen der Lysinreste frei und diese Reste demnach über die ϵ -Aminogruppen miteinander verknüpft. Dem Lysinpeptid aus Fraktion S_0 kann daher Formel VII zugeschrieben werden.

REDUZIEREND WIRKENDE ABBAUPRODUKTE

Auf neue Abbauprodukte stießen wir, als die Papierchromatogramme des Geomycin-Partialhydrolysates an Stelle von Ninhydrin mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid besprüht wurden. Dabei entstanden nämlich zwei rote Zonen, von denen die größere im R_F -Wert mit β -Lysin, die kleinere mit dem Abbauprodukt S_1 übereinstimmte. Wie sich papierchromatographisch zeigen ließ, verschwinden die durch diese Farbreaktion charakterisierten, im folgenden als R_1 und R_2 bezeichneten Abbauprodukte im weiteren Verlauf der Hydrolyse wieder, was verständlich macht, daß sie in den früher untersuchten Totalhydrolysaten¹⁾ nicht gefunden wurden.

Während im Papierchromatogramm R_1 und R_2 von β -Lysin und S_1 nicht zu trennen waren, gelang dies am Kationen-Austauscher Dowex 50 X 12. Mit 0,7*n* HCl wurde als erste eine

⁷⁾ Die Stellung der Amino- und Hydroxygruppe in der Seitenkette ist noch nicht bewiesen; sie könnten auch vertauscht sein.

Fraktion eluiert, die weder β -Lysin noch S_1 enthielt. Im Papierchromatogramm bildete sie zwei Zonen mit den R_F -Werten von R_1 und R_2 , die sich nicht nur mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid, sondern ebenso empfindlich auch durch ihre Blaufärbung mit Ninhydrin sichtbar machen ließen. Die Farbintensitäten der R_1 - und R_2 -Zone verhielten sich etwa wie 7:1. R_1 zeigte in fünf Lösungsmittelsystemen den gleichen R_F -Wert wie Glucosamin.

Eine Trennung von R_1 und R_2 an sauren Austauschern ist uns bisher nicht gelungen; für die folgenden Versuche verwendeten wir daher ein Gemisch von R_1 und R_2 . Es reduzierte FEHLINGSche Lösung, gab jedoch keine MOHLISCH-Reaktion. Dagegen war die ELSON-MORGAN-Reaktion positiv und etwa gleich stark wie bei Glucosamin. Ihr positiver Ausfall spricht für Nachbarstellung einer Aminogruppe zu einer Carbonyl- bzw. potentiellen Carbonylgruppe.

Das Vorliegen einer freien Aminogruppe in R_1 bzw. R_2 wurde dadurch bestätigt, daß das Gemisch beider leicht mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol reagiert. Dabei entstand ein gelbes, Triphenyl-tetrazoliumchlorid reduzierendes Reaktionsprodukt, dessen Papierchromatogramm in mehreren Lösungsmittelsystemen nur eine Zone zeigte.

Beim Erwärmen mit 20-proz. Salzsäure spalteten R_1 und R_2 ebenso wie Glucosamin Ammoniak ab. Das bei der Totalhydrolyse des Geomycins entstehende Ammoniak entstammt demnach unter anderem dem Teil der Geomycin-Molekel, aus dem die Abbauprodukte R_1 und R_2 hervorgehen. Auch durch 16stdg. Erhitzen mit Wasser auf 110° ließ sich das Gemisch aus R_1 und R_2 unter Abspaltung von Ammoniak abbauen.

Wie oben erwähnt, wurden bei der Totalhydrolyse des Geomycins in sehr kleiner Menge ninhydrinpositive Abbauprodukte mit den R_F -Werten von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Serin, Alanin und Glycin gefunden. Bemerkenswert ist, daß diese Abbauprodukte in sehr geringer und unterschiedlicher Menge auch bei der Totalhydrolyse des R_1 , R_2 -Gemisches entstehen.

R_1 ist in vieler Hinsicht dem Glucosamin ähnlich. Dennoch kann es nicht mit ihm identisch sein, denn nach ST. MOORE und W.H. STEIN⁸⁾ wird Glucosamin aus einer Dowex 50 X 4-Säule zwischen Alanin und Ammoniak eluiert, R_1 dagegen aus einer Dowex 50 X 12-Säule bereits vor Asparaginsäure. Die frühzeitige Elution von R_1 könnte dadurch bedingt sein, daß es eine Carboxygruppe enthält.

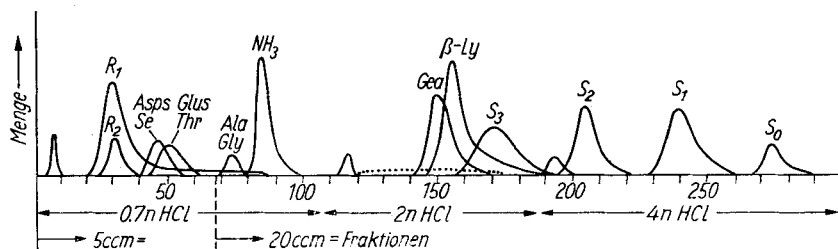
Ein weiterer Unterschied zwischen R_1 und Glucosamin besteht darin, daß Glucosamin ein Osazon bildet, das unscharf bei 200° schmilzt, während das Gemisch von R_1 und R_2 mit Phenylhydrazin ein Reaktionsprodukt lieferte, das bis 300° keinen Schmp. zeigte.

ABBAUPRODUKT S_3

Besprüht man das Papierchromatogramm (Butanol/Eisessig/Wasser, 2:1:1) des durch 25 Min. langes Kochen mit 20-proz. Salzsäure erhaltenen Geomycin-Partialhydrolysates mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat, so entstehen zwei dunkelviolette Flecke, der eine von Geamin herrührend, der andere (auch in früheren Versuchen schon beobachtet¹¹⁾) mit dem R_F -Wert von S_1 (Tri- β -lysin). Da S_1 mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat nicht reagiert, enthält die S_1 -Zone des Papierchromatogrammes demnach neben S_1 ein weiteres Abbauprodukt, das im folgenden als S_3 bezeichnet ist. Papierchromatographisch ließ sich zeigen, daß seine Menge wie bei den Abbauprodukten S_1 und S_2 im Verlauf der Hydrolyse zunächst zu- und dann wieder abnimmt.

⁸⁾ J. biol. Chemistry **211**, 893 [1954].

Eine Abtrennung der Fraktion S_3 von den anderen Produkten der Partialhydrolyse gelang am Kationen-Austauscher Dowex 50 X 12, als mit steigender Salzsäure-Konzentration ($0.7\text{ n} - 4\text{ n HCl}$) nachgewaschen wurde. Wie das Elutionsdiagramm (Abbild. 3) zeigt, folgte S_3 dem β -Lysin und war nicht vollständig von diesem zu trennen. Nach S_3 erschienen im Eluat zunächst S_2 (Di- β -lysin), dann S_1 (Tri- β -lysin) und schließlich S_0 (Tetra- β -lysin). Erwartungsgemäß wurden β -Lysin und seine Peptide durch Säure nach Maßgabe ihrer Basizität abgelöst, d. h. die mit der geringsten Zahl Aminogruppen am leichtesten⁹⁾.



Abbild. 3. Elutionsdiagramm eines Geomycin-Partialhydrolysates. H-Form des Kationen-Austauschers Dowex 50 X 12. Elution mit Salzsäure steigender Konzentration

Das β -Lysin, das dem aus der Säule eluierten S_3 beigemischt war, ließ sich auch durch nochmalige Adsorption nicht vollständig entfernen. Frei von β -Lysin dagegen war ein S_3 -Präparat, das wir in kleiner Menge durch Papierchromatographie gereinigt hatten.

Das Totalhydrolysat von S_3 (konz. Salzsäure, 24 Std., 110°) enthielt Ammoniak und zeigte im Papierchromatogramm: 1) eine Hauptzone, die auf Grund ihres R_F -Wertes und ihrer Violettfärbung mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat dem Geamin zugeordnet werden konnte; 2) eine schwache ninhydrinpositive Zone mit dem gleichen R_F -Wert wie β -Lysin und R_1 . Da sie sich mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid rot färbte, lag offenbar R_1 vor.

Wenn R_1 ein Abbauprodukt von S_3 ist, sollte die R_1 -Zone in Partialhydrolysaten von S_3 — besonders im Vergleich zur Geamin-Zone — stärker hervortreten als in Totalhydrolysaten. Bis zu einem gewissen Grade fanden wir das auch bestätigt, doch war der R_1 -Fleck (neben dem auch ein schwacher R_2 -Fleck zu sehen war) bei weitem nicht so intensiv wie der des Geamins. Ob dies der Säureempfindlichkeit von R_1 zu verdanken ist, bleibt zunächst offen. Und ebenso bleibt ungewiß, ob das im Hydrolysat von S_3 nachgewiesene Ammoniak allein dem R_1 oder zum Teil auch noch anderen Bestandteilen von S_3 entstammt. Dagegen kann als sicher gelten, daß S_3 kein β -Lysin enthält. Denn andernfalls hätte sich im Totalhydrolysat von S_3 ein β -Lysinfleck von annähernd gleicher Intensität wie der des Geamins zeigen müssen.

Die Säureempfindlichkeit von S_3 macht verständlich, daß beim Eluieren des Geomycin-Partialhydrolysates mit Säure in dem die Fraktionen 120–170 umfassenden Abschnitt geringe Mengen R_1 auftraten (in Abbild. 3 punktierte Linie).

⁹⁾ Die oben beschriebene Trennung der β -Lysinpeptide (Abbild. 1) wurde am Anionen-Austauscher vorgenommen, weil wir befürchteten, daß am sauren Austauscher beim Eluieren mit stärkerer Säure Hydrolyse der β -Lysinpeptide eintreten würde. Wie das Elutionsdiagramm (Abbild. 3) zeigt, war diese Befürchtung unberechtigt.

Die vorstehenden Befunde lassen sich am besten durch die Annahme deuten, daß im Abbauprodukt S_3 das Geamin mit einem Rest verbunden ist, der bei Hydrolyse unter Bildung von R_1 und R_2 abgelöst wird.

HYDROLYSE VON GEOMYCIN-HYDROCHLORID MIT SIEDENDEM WASSER

Bei Versuchen, unter möglichst milden Bedingungen abzubauen, fanden wir, daß aus Geomycin-hydrochlorid bereits beim Kochen mit Wasser Geamin abgespalten wird. Da der p_H -Wert einer 3-proz. Geomycin-hydrochlorid-Lösung bei 20° etwa 2.5 beträgt, handelt es sich um eine Hydrolyse bei schwach saurer Reaktion. Papierchromatographisch ließ sich zeigen, daß Geamin schon kurz nach Beginn der Hydrolyse vorhanden und seine Menge nach 24 Stdn. optimal war. β -Lysin fand sich nach dieser Zeit nur in Spuren. Das Papierchromatogramm des 24-Stdn.-Hydrolysates zeigte einen langgezogenen Ninhydrinfleck, der sich vom Startpunkt bis zur Lage des Abbauproduktes S_1 erstreckte. Reduzierende Substanzen waren nicht nachzuweisen, dagegen enthielt das Hydrolysat Ammoniak.

Eine Auftrennung des Wasserhydrolysates gelang an einer Säule des stark basischen Austauschers Dowex 1 X 8 (OH-Form) beim Nachwaschen mit 0.6 n NH_3 . Dabei lief zunächst eine im folgenden als B bezeichnete Fraktion ins Filtrat, der das Geamin sowie Spuren von ninhydrinpositiven Abbauprodukten mit den R_F -Werten von S_0 und S_1 folgten.

Im Totalhydrolysat von B war neben Ammoniak papierchromatographisch nur β -Lysin, im Partialhydrolysat β -Lysin sowie ninhydrinpositive Fraktionen mit den R_F -Werten von S_0 , S_1 und S_2 nachzuweisen.

Das Papierchromatogramm von B zeigte eine längere, verwaschene Zone, in der zwei stärker gefärbte Flecke von gleicher Intensität lagen. Vorversuche, die Fraktion B am stark sauren Kationen-Austauscher Dowex 50 X 12 weiter aufzutrennen, blieben erfolglos. Zur Elution mußte 4–6 n HCl verwendet werden, wobei B teilweise abgebaut wurde. Denn im Papierchromatogramm des Eluates fanden sich die Abbauprodukte S_0 und S_1 , aber keine B-Fraktion. Den bisherigen Befunden nach könnte die B-Fraktion eine Mischung aus Tri- β -lysin-amid und Tetra- β -lysin-amid sein.

ABBAU DES GEOMYCINS MIT 20-PROZ. SALZSÄURE BEI RAUMTEMPERATUR

Für unsere Versuche, Geomycin unter möglichst milden Bedingungen abzubauen, brauchten wir, um auch geringfügig verändertes Geomycin papierchromatographisch zu erkennen, ein Lösungsmittelsystem, in dem Geomycin nicht allzu langsam wandert. Diese Anforderung erfüllt das Gemisch Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (8:5:8:6). In ihm bildete das für die Versuche dieser Arbeit verwendete Geomycin im Ringchromatogramm zwei mit Ninhydrin blauviolett werdende Zonen, von denen nur die äußere im Plattentest antibiotisch wirksam war. Eine Auftrennung in mehrere antibiotisch wirksame Zonen³⁾, war in diesem System nicht zu beobachten.

Ring-Papierchromatographie des Geomycins in drei Papierpacks zu je 70 Bögen lieferte so viel Geomycin und Begleitsubstanz, daß von beiden Total- und Partialhydrolysate papierchromatographisch miteinander verglichen werden konnten. Ein Unterschied war dabei nicht festzustellen.

Für die Deutung der oben erörterten Abbauprobversuche war entscheidend, ob die Substanz mit dem kleineren R_F -Wert das Geomycin von Beginn der Isolierung an durch alle Reinigungsoperationen begleitet oder erst während der Aufarbeitung aus Geomycin entsteht. Aufklärung darüber hat die milde Salzsäure-Hydrolyse des von der Begleitsubstanz befreiten Geomycins gebracht. Als wir nämlich dessen Lösung in 20-proz. Salzsäure 4 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrten, zeigte das Papierchromatogramm der Reaktionslösung nur eine einzige, ninhydrinpositive, im Platten-test antibiotisch unwirksame Zone mit dem gleichen R_F -Wert wie die Begleitsubstanz des Geomycins. Dagegen waren β -Lysin, β -Lysinpeptide, Geamin oder reduzierende Produkte nicht nachzuweisen. Die Veränderung, die Geomycin unter den angegebenen Bedingungen erfährt und die zum Verlust der antibiotischen Wirksamkeit führen, kann demnach nicht tiefgreifend sein.

Aus der Beobachtung, daß ein im System Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (8:5:8:6) chromatographisch einheitliches Geomycin durch kurze Säureeinwirkung, ohne Auftreten anderer Spaltprodukte, in eine antibiotisch unwirksame Verbindung übergeht, die den gleichen R_F -Wert hat wie die Begleitsubstanz des über das Pikrat gereinigten Geomycins, glauben wir schließen zu dürfen, daß die Begleitsubstanz während der Reinigungsoperationen aus Geomycin entsteht. Da sie dessen erstes Hydrolyseprodukt ist (im folgenden als Umwandlungsprodukt A bezeichnet), ändert ihr Vorhandensein in dem für unsere Abbauprobversuche verwendeten Geomycin nichts an der Deutung dieser Versuche.

ABBAU VON DNP-GEOMYCIN

Um zu sehen, wie weit die Aminogruppen der im Geomycin vorhandenen Aminosäuren an deren Bindung beteiligt sind, haben wir Geomycin mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt und dann hydrolytisch abgebaut. Um die träge reagierenden β -Aminogruppen des β -Lysins möglichst weitgehend zu erfassen, wurde die Umsetzung in absol. Methanol durchgeführt und die Reaktionszeit auf 24 Stdn. ausgedehnt. Das DNP-Derivat des Geomycins fiel dabei als Niederschlag aus. Versuche, es zur Kristallisation zu bringen, waren bisher erfolglos.

Das Totalhydrolysat des DNP-Derivates zeigte im Papierchromatogramm drei gelbe Zonen, die an Hand ihrer R_F -Werte dem DNP-Geamin, β -DNP- β -Lysin und 2,4-Dinitranilin zugeordnet werden konnten. DNP-Geamin wurde außerdem durch die Braunfärbung mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat und β -DNP- β -Lysin durch seine positive Ninhydrin-Reaktion charakterisiert. 2,4-Dinitrophenyl-Derivate der Abbauprodukte R_1 und R_2 fehlten. Dagegen waren mehrere schwache, ninhydrinpositive Zonen sichtbar, die ihren R_F -Werten nach dem Geamin, β -Lysin und den oben erwähnten, bei Totalhydrolyse des Geomycins in kleiner Menge entstehenden Aminosäuren zuzuschreiben waren. Eine Erklärung für das Auftreten kleiner Mengen Geamin und β -Lysin sehen wir darin, daß Geomycin nicht vollständig an allen freien Aminogruppen mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol reagiert hat.

Um die Herkunft des 2,4-Dinitranilins zu klären, wurde zunächst untersucht, ob die DNP-Derivate des β -Lysins und Geamins unter den angewandten Hydrolysebedingungen 2,4-Dinitranilin abspalten. Das war nicht der Fall. Dagegen stellte sich heraus, daß das 2,4-Dinitrophenyl-Derivat der reduzierenden Abbaufraktion $R_1 + R_2$ bei

saurer Hydrolyse schnell 2.4-Dinitranilin liefert. Danach entstammt das im Hydrolysat des DNP-Geomycins gefundene 2.4-Dinitranilin offenbar dem Teil der Geomycin-Molekel, der bei saurer Partialhydrolyse als R_1 und R_2 abgelöst wird.

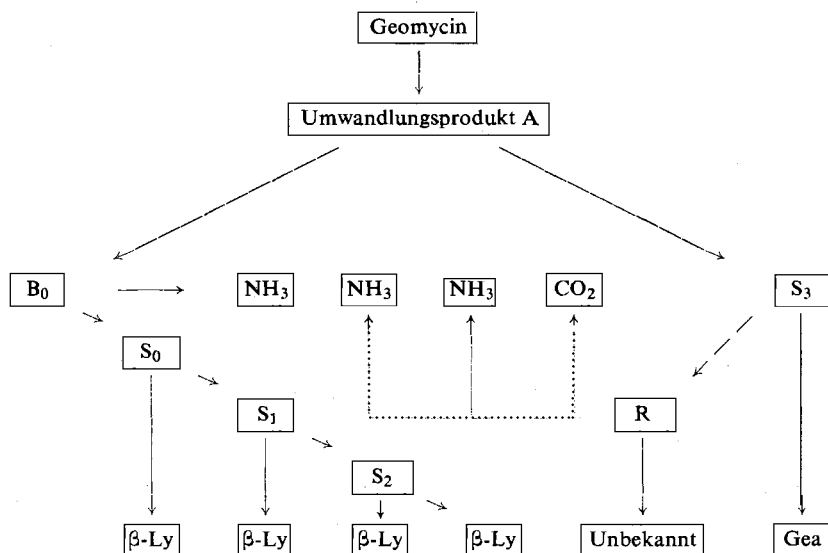
Daß aus dem DNP-Derivat von $R_1 + R_2$ hydrolytisch leicht 2.4-Dinitranilin abgespalten wird, ist nicht überraschend, denn aus $R_1 + R_2$ wird, wie oben gezeigt, hydrolytisch leicht Ammoniak freigesetzt.

Nimmt man an, daß die in der Abbaufraktion $R_1 + R_2$ vorhandene Aminogruppe in der Geomycin-Molekel frei vorliegt, so wird das Auftreten von 2.4-Dinitranilin im DNP-Geomycin-Hydrolysat verständlich.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Abbild. 4 zeigt schematisch die bisherigen Ergebnisse beim Säureabbau des Geomycins. Er beginnt zweifellos mit der Bildung des antibiotisch unwirksamen Umwandlungsproduktes A, aus dem bei weiterer Hydrolyse die β -Lysinpeptid-Kette als Tetra- β -lysin-amid (B_0) bzw. Tetra- β -lysin (S_0) herausgespalten wird.

Weniger klar ist der Abbau des an der Lysin-Kette hängenden Molekel-Teils. Als gesichert darf hier gelten, daß Geamin über das Zwischenprodukt S_3 abgespalten werden kann. Dieser Befund sowie die Tatsache, daß bei der Partialhydrolyse niemals ein Abbauprodukt gefunden wurde, in dem neben Geamin auch β -Lysin vorhanden ist, zeigt: Geamin ist offenbar nicht unmittelbar mit dem β -Lysinpeptid der Geomycin-Molekel verbunden, sondern mit dem Teil, der bei Partialhydrolyse die reduzierend wirkenden Abbauprodukte R_1 und R_2 (R) liefert.



Abbild. 4. Schema der Säurehydrolyse von Geomycin. — — — vermutlicher Hydrolyseverlauf; möglicher Hydrolyseverlauf

Da im Totalhydrolysat des DNP-Geomycins ein DNP-Geamin gefunden wurde, das papierchromatographisch mit dem aus Geamin erhaltenen DNP-Derivat übereinstimmt, und da

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Papierchromatographische Verfolgung der Geomycin-Hydrolyse: Aus einer unter Rückfluß kochenden Lösung von 250mg Geomycin-hydrochlorid in 5 ccm 20-proz. Salzsäure entnahm man zu verschiedenen Zeiten je 0.10ccm, verdampfte zur Trockne, löste den Rückstand in 0.09ccm Wasser und verwendete 1.5 ccm davon zur Papierchromatographie¹⁰⁾. Die Menge der ninhydrinpositiven (besprüht mit 0.2-proz. butanol. Ninhydrinlösung, 10 Min. bei 110° getrocknet) Zwischenprodukte war nach 25 Min. am größten. Das gleiche Ergebnis erhielt man: 1) Nach 15 stdg. Erhitzen mit 20-proz. Salzsäure auf 80° und 2) mit kochender *n* HCl nach 23 Stdn.

Isolierung der Zwischenprodukte S₀, S₁ und S₂: Eine Lösung von 2 g Geomycin-hydrochlorid in 10ccm 20-proz. Salzsäure wurde 25 Min. unter Rückfluß gekocht und bei 20° i. Vak. über festem Natriumhydroxyd verdampft. Den braunen, sirupösen Rückstand nahm man in einigen ccm Wasser auf, verdampfte nochmals i. Vak., löste in 10ccm Wasser, entfernte den Rest der Salzsäure durch Elektrodialyse (Apparatur von T. ASTRUP, A. STAGE und E. OLSEN¹¹⁾) und verdampfte die alkalisch gewordene Lösung i. Vak. über Natriumhydroxyd.

Die Lösung des Rückstandes in 2ccm 0.6 *n* NH₃ gab man auf eine Säule (1.5 × 42 cm) des stark basischen Anionen-Austauschers Dowex 1 X 8 (200–400 mesh; OH-Form mit 0.6 *n* NH₃ ins Chromatogrammrohr eingeschlämmt und einige Stdn. mit 0.6 *n* NH₃ gewaschen), wusch mit 0.6 *n* NH₃ nach (Durchlaufgeschwindigkeit: 40 ccm/Stde.) und fing mit einem automatischen Sammler 40 ccm-Fractionen auf.

Um das Elutionsdiagramm (Abbild. 1) zu erhalten, wurde 1 ccm aus jeder zweiten Fraction bei 50° i. Vak. verdampft, der Rückstand in 10ccm Wasser gelöst und 6ccm davon zur Ringchromatographie auf einen Achtel-Sektor des Startkreises aufgetragen. Auf jeden Bogen brachte man Proben von sechs aufeinander folgenden Fractionen sowie (in zwei einander gegenüberliegenden Achtel-Sektoren) zwei Proben des Partialhydrolysates, hielt die Bögen kurze Zeit in einer Chlorwasserstoff-Atmosphäre, um die aufgetragenen Substanzen in die Hydrochloride zu verwandeln und entwickelte dann¹⁰⁾. Aus der Lage der mit Ninhydrin sichtbar gemachten Zonen war zu ersehen, welches der Abbauprodukte S₀, S₁ und S₂ in der betreffenden Eluatfraction vorlag.

Die Fractionen: 70–76 (S₀), 82–90 (Geamin), 100–116 (S₁), 130–150 (S₂) und 174–218 (β-Lysin) verdampfte man i. Vak. bei 40° zur Trockne, nahm die gelblichen, hygroskopischen Rückstände in 3ccm Wasser auf und verwendete diese Lösungen für die weiteren Versuche.

Totalhydrolyse der Zwischenprodukte: Je 0.2ccm der Lösungen von S₀, S₁ und S₂ versetzte man mit dem gleichen Vol. konz. Salzsäure, erhitze 16 Stdn. im geschlossenen Röhrchen auf 110° und verdampfte i. Vak. über Natriumhydroxyd. Die Rückstände zeigten im Ringchromatogramm eine intensive, ninhydrinpositive Zone mit dem gleichen R_F-Wert wie β-Lysin. Im Hydrolysat von S₀ und S₁ fand sich daneben eine schwache Zone mit dem R_F-Wert des Geamins, deren Intensität ebenso gering war wie bei nicht hydrolysiertem S₀ bzw. S₁.

Partialhydrolyse der Zwischenprodukte: Man verfuhr wie bei der Totalhydrolyse, erhitze jedoch nur 25 Min. und chromatographierte die Verdampfungsrückstände mit absteigender Phase.

Umsetzung des L-β-Lysins mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol: a) Eine Lösung von 5 mg L-β-Lysin und 50 mg Natriumhydrogencarbonat in 2.8ccm 65-proz. Äthanol wurde nach Zugabe von 0.26ccm einer 2.5-proz. äthanolischen 2.4-Dinitro-fluorbenzol-Lösung 3 Stdn. geschüttelt,

¹⁰⁾ Sofern nicht anders vermerkt, wurde das System: Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1) mit absteigender mobiler Phase auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier Nr. 2043 b verwendet.

¹¹⁾ Acta chem. scand. 5, 1343 [1951].

dann mit 5ccm Wasser versetzt und zweimal mit je 2ccm Äther extrahiert. Die mit 1ccm 20-proz. Salzsäure angesäuerte wäßrige Phase schüttelte man zweimal mit je 2ccm Essigester und (nach Zugabe von Kochsalz, um die Phasentrennung zu verbessern) zweimal mit je 2ccm sek.-Butanol, verdampfte die Auszüge i. Vak. und löste den Rückstand in je 0.2ccm Eisessig. Von jeder der beiden Lösungen wurden 4cm strichförmig an getrennten Plätzen auf die Startlinie eines quadratischen Filtrierpapierbogens (Viertel-Bogen, Schleicher & Schüll Nr. 2043b) gebracht. Den zur Zylinderform zusammengeklammerten Bogen stellte man mit der Startlinie nach unten in eine mit 1.5 *m* Phosphatpuffer (p_H 6.0) gefüllte Petrischale, die in einem Exsikkator stand, und trocknete den Bogen, als die Lösungsmittelfront den oberen Zylinderrand erreicht hatte.

Der Rückstand des Essigester-Extraktes gab zwei Zonen: Bis-DNP- β -Lysin ($R_F = 0$) und 2.4-Dinitro-phenol ($R_F = 0.24$). Der Rückstand des sek.-Butanol-Auszuges zeigte eine Hauptzone ($R_F = 0.42$) und eine sehr schwache Nebenzone ($R_F = 0.55$), die im R_F -Wert mit synthetischem β -DNP- β -Lysin übereinstimmte. Die Hauptzone mußte demnach das ϵ -DNP- β -Lysin enthalten.

b) *Überschuß an 2.4-Dinitro-fluorbenzol*: Wie vorstehend wurden 5 mg L- β -Lysin mit 1ccm 2.5-proz. äthanolischer 2.4-Dinitro-fluorbenzol-Lösung umgesetzt und aufgearbeitet. Das Chromatogramm des Essigester-Auszuges zeigte zwei Zonen: Bis-DNP- β -Lysin ($R_F = 0$) und 2.4-Dinitro-phenol ($R_F = 0.24$). Der sek.-Butanol-Auszug gab nur eine Zone mit dem R_F -Wert 0.42 von ϵ -DNP- β -Lysin.

Umsetzung von DL-Lysin mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol: a) 5 mg DL-Lysin-hydrochlorid wurden wie vorstehend mit der äquivalenten Menge 2.4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt. Der Essigester-Auszug enthielt Bis-DNP- β -Lysin ($R_F = 0$) und 2.4-Dinitro-phenol ($R_F = 0.24$), der sek.-Butanol-Extrakt ϵ -DNP-Lysin ($R_F = 0.37$) und α -DNP-Lysin ($R_F = 0.50$) in etwa gleicher Menge.

b) 5 mg DL-Lysin-hydrochlorid wurden in gleicher Weise wie β -Lysin mit überschüssigem 2.4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt. Der Essigester-Auszug zeigte im Papierchromatogramm die Zone des Bis-DNP- β -Lysins ($R_F = 0$) und eine schwache Zone von 2.4-Dinitro-phenol ($R_F = 0.24$). Die wäßrige Phase war nach der Extraktion mit Essigester farblos und enthielt demnach kein α - bzw. ϵ -Mono-DNP- β -Lysin.

Umsetzung der Zwischenprodukte S_0 , S_1 und S_2 mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol: Je 0.6ccm der oben erwähnten Lösungen von S_0 , S_1 und S_2 versetzte man mit 100mg Natriumhydrogencarbonat, 3.4ccm 60-proz. Äthanol und 2ccm einer 2.5-proz. äthanol. 2.4-Dinitro-fluorbenzol-Lösung, schüttelte 4 Stdn., verdünnte mit 6ccm Wasser und extrahierte zweimal mit 5ccm Äther. Als dann mit 2ccm 20-proz. Salzsäure angesäuert und zweimal mit Essigester ausgeschüttelt wurde, blieb die wäßr. Phase gelb, ein Zeichen, daß sie unvollständig dinitrophenylierte Anteile enthielt.

Die vereinigten Essigester-Auszüge wusch man mit 3ccm Wasser, verjagte das Lösungsmittel i. Vak., nahm den Rückstand in 0.4ccm Eisessig auf, verdünnte mit 1ccm 20-proz. Salzsäure und erhitze im zugeschmolzenen Röhrchen 16 Stdn. auf 110°. Die Reaktionslösung wurde i. Vak. über Natriumhydroxyd verdampft, der Rückstand in 0.2ccm Eisessig aufgenommen und 4cm dieser Lösung zur Papierchromatographie verwendet.

Die Hydrolysate wurden papierchromatographisch verglichen mit Bis-DNP- β -Lysin, β -DNP- β -Lysin und ϵ -DNP- β -Lysin in a) 1.5 *m* Phosphatpuffer (p_H 6.0); b) Butanol (gesättigt mit 0.1-proz. Ammoniak) und c) Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (25:28:21). In keinem Hydrolysat fand man eine Zone mit dem R_F -Wert von ϵ -DNP- β -Lysin.

Isolierung der Zwischenprodukte R_1 , R_2 und S_3 : Eine Lösung von 1g Geomycin-hydrochlorid in 10ccm 20-proz. Salzsäure wurde 25 Min. unter Rückfluß gekocht und i. Vak. über

festem Natriumhydroxyd verdampft. Nach Zugabe von 5 ccm Wasser und nochmaligem Eindampfen (zur Entfernung restlicher Salzsäure) nahm man den braunen Rückstand in 2 ccm Wasser auf und gab die Lösung auf eine Säule (2×26 cm) des stark sauren Kationen-Austauschers Dowex 50 X 12, 200–400 mesh (H-Form, mit 0.7 *n* HCl ins Chromatogrammröhr eingeschlämmt und 15 Stdn. mit 0.7 *n* HCl gewaschen), wusch mit 0.7 *n* HCl nach und fing mit einem automatischen Sammler das Eluat zunächst in 5-ccm-Anteilen und ab Fraktion 68 in 20-ccm-Anteilen auf. Ab Fraktion 107 wurde mit 2 *n* HCl, von Fraktion 187–300 mit 4 *n* HCl eluiert. Durchlaufgeschwindigkeit 30 ccm/Stde.

Zur Aufstellung des Elutionsdiagrammes (Abbild. 3) verdampfte man 0.5 ccm von jeder zweiten Fraktion bei 50° i. Vak. und nahm die Rückstände in je 11 cmm Wasser auf. Zur Papierchromatographie der Proben wurden Viertel-Bogen Filtrierpapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) mit einer Startlinie (1.5 cm Abstand vom Rand) versehen, auf der zwanzig Startpunkte mit den zugehörigen Fraktions-Nr. markiert waren. Einer der mittleren Startpunkte blieb zur Aufnahme eines Vergleichsgemisches reserviert. Um die Chromatogramme später mit zwei verschiedenen Reagenzien behandeln zu können, wurden für jede Probenreihe zwei Bögen angelegt. Nachdem sie so zur Zylinderform zusammengeklammert waren, daß die Startlinie ringförmig wurde, brachte man auf jeden Startpunkt 4 cmm der entsprechend nummerierten Probenlösung und auf den freigelassenen Startpunkt 4 cmm einer etwa 10-proz. Lösung des Geomycin-Partialhydrolysates, stellte nach Eintrocknen der Lösungen die Papierzylinder mit den Startlinien nach unten in Petrischalen, die 30 ccm Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1) enthielten, und verwahrte sie in geräumigen Exsikkatoren. Als nach etwa 8 Stdn. die Lösungsmittelfront den oberen Zylinderrand erreicht hatte, wurden die Zylinder 10 Min. bei 110° getrocknet und entrollt. Auf dem einen Bogen machte man die Zonen mit Ninhydrin, auf dem anderen (auf dem die gleiche Fraktionsreihe aufgetragen war) mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid sichtbar.

Die vereinigten Eluate Nr. 22–36 hinterließen beim Verdampfen i. Vak. die reduzierend wirkende Abbaufraktion $R_1 + R_2$ als gelblichen Sirup. Die Eluate 170–188 lieferten, in gleicher Weise eingedampft, das Abbauprodukt S_3 ebenfalls als gelblichen Sirup. $R_1 + R_2$ zeigte im System Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1) zwei sich mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid rot färbende Zonen R_1 und R_2 mit den gleichen R_F -Werten wie β -Lysin und S_1 .

Umsetzen von Fraktion R mit Phenylhydrazin: Die Vorschrift von SHRINER und FUSON¹²⁾ zur Darstellung von Osazonen wurde in 20fach verkleinertem Maßstab mit Fraktion R sowie zur Kontrolle mit D-Glucosamin durchgeführt. Aus D-Glucosamin wurden gelbe Nadeln vom Schmp. 196–200° erhalten, aus Fraktion $R_1 + R_2$ gelbe, sehr kleine Stäbchen, die sich ab 250° zersetzten, ohne zu schmelzen.

Umsetzen von Fraktion $R_1 + R_2$ mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol: Eine Lösung von 5 mg Fraktion $R_1 + R_2$ in 2 ccm 50-proz. Äthanol versetzte man nach Zugabe von 50 mg Natriumhydrogencarbonat mit 1 ccm einer äthanol. 2,4-Dinitro-fluorbenzol-Lösung (250 mg/10 ccm), schüttelte 2 Stdn., gab 5 ccm Wasser hinzu und extrahierte zweimal mit 2 ccm Äther. Die wäßrige Phase säuerte man mit 1 ccm 20-proz. Salzsäure an, extrahierte dreimal mit 2 ccm Essigester (um 2,4-Dinitro-phenol zu entfernen) und schüttelte den in der wäßr. Phase verbliebenen Anteil mit sek.-Butanol aus. Das beim Verdampfen des sek.-Butanols hinterbleibende DNP-Derivat von Fraktion $R_1 + R_2$ zeigte in Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1) eine Zone mit gleichem R_F -Wert wie β -DNP- β -Lysin, die sich zum Unterschied von diesem jedoch mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid rot färbte. Bei der Papierchromatographie mit Pufferlösungen vom p_H 2–11 (aufsteigende mobile Phase) bildete das DNP-Derivat nur eine Zone. Nach

¹²⁾ R. L. SHRINER und R. C. FUSON, Systematic Identification of Organic Compounds, New York, London 1948, S. 116.

halbstdg. Kochen des DNP-Derivates mit 20-proz. Salzsäure war im Papierchromatogramm des Hydrolysates (mobile Phase: Pufferlösung, p_H 2—11) 2,4-Dinitranilin und nur noch wenig Ausgangsmaterial nachzuweisen.

Hydrolyse von Fraktion $R_1 + R_2$ mit Salzsäure: Proben von Fraktion $R_1 + R_2$ erhitze man in geschlossenen Röhrchen mit 20-proz. Salzsäure und verglich den Rückstand papierchromatographisch mit Fraktion $R_1 + R_2$. Schon nach 30 Min. langem Erhitzen war eine merkliche Abnahme von R_1 festzustellen und R_2 nicht mehr nachzuweisen. Nach 12stdg. Erhitzen waren R_1 und R_2 verschwunden. In allen Hydrolysaten konnte nach Neutralisation mit Magnesiumoxyd Ammoniak nachgewiesen werden.

Abbau der Fraktion S_3 : Eine Lösung von S_3 in 2ccm Wasser gab man (um beigemengtes β -Lysin abzutrennen) auf eine Säule von Dowex 50 X 12 (200—400 mesh, H-Form), eluierte mit 2.5 n HCl und fing das Eluat in 10-ccm-Anteilen auf. Fraktionen 26—33 enthielten laut Papierchromatogramm nur S_3 , während sich in den folgenden Fraktionen 34—52 neben S_3 noch β -Lysin nachweisen ließ.

Die β -lysinfreie Fraktion löste man in 0.5ccm Wasser, versetzte 0.1ccm dieser Lösung mit 0.1ccm konz. Salzsäure und erhitze 24 Stdn. auf 110°. Der Eindampfrückstand des Hydrolysates zeigte im Papierchromatogramm (aufsteigende mobile Phase) eine Hauptzone, die sich durch R_F -Wert und Violettärfärbung mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat als Geamin zu erkennen gab. Daneben fanden sich sehr schwach ausgeprägt: a) eine mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid rot werdende Zone mit dem gleichen R_F -Wert wie R_1 und b) mehrere ninhydrinpositive Flecke mit den R_F -Werten von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Threonin und Alanin. Nach Neutralisation mit Magnesiumoxyd war Ammoniak nachzuweisen.

Als S_3 wie vorstehend nur 30 Min. mit Salzsäure erhitzt wurde, zeigte das Papierchromatogramm neben der Hauptzone von S_3 die des Geamins, des Abbauproduktes R_1 und sehr schwach die von R_2 . Auch hier war nach Neutralisation mit Magnesiumoxyd Ammoniak nachzuweisen.

Hydrolyse von Geomycin-hydrochlorid mit Wasser: a) Eine Lösung von 250mg Geomycin-hydrochlorid in 5ccm Wasser kochte man 64 Stdn. unter Rückfluß, entnahm zu verschiedenen Zeiten Proben von 0.1ccm und verdampfte sie i. Vak. über Natriumhydroxyd. Den Rückstand jeder Probe löste man in 50ccm Wasser und verwendete 3ccm davon zur Papierchromatographie¹⁰⁾ (Entwicklung mit Ninhydrin). Ein sehr schwacher β -Lysinfleck trat erst nach 24stdg. Kochen auf. Der Geaminfleck war schon kurz nach Beginn der Hydrolyse zu erkennen, wurde in deren Verlauf schnell intensiver und erreichte nach 24 stdg. Kochen die gleiche Intensität wie in einem mit gleicher Menge durchgeführten Totalhydrolysat (24 Stdn., 20-proz. HCl) von Geomycin-hydrochlorid. Ein Fleck mit dem gleichen R_F -Wert wie das Abbauprodukt S_2 erschien erst nach 24stdg. Kochen und wurde dann langsam intensiver. Die übrigen Abbauprodukte bildeten eine langgezogene, blauviolette Zone, die vom Startpunkt bis zum Fleck des Abbauproduktes S_1 reichte und sich im Lauf der Hydrolyse nicht änderte.

b) Eine Lösung von 500mg Geomycin-hydrochlorid in 10ccm Wasser wurde 24 Stdn. unter Stickstoff gekocht (Braunfärbung) und dann i. Vak. verdampft. Die Lösung des Rückstandes in 2ccm 0.6 n NH_3 gab man auf eine mit 0.6 n NH_3 eingeschlammte Säule des Anionen-Austauschers Dowex 1 X 8 (200—400 mesh, OH-Form), wusch mit 0.6 n Ammoniak nach, fing das Eluat in 40-ccm-Fractionen auf (Durchlaufgeschwindigkeit 50ccm/Stde.) und untersuchte sie, wie oben bei der Trennung der Zwischenprodukte R_1 , R_2 und S_3 beschrieben, im Papierchromatogramm. Die Eluate 1—3 enthielten die Abbaufraction B, die Eluate 48—64 Geamin. Spuren von S_0 und S_1 fanden sich in den Eluat 46—51 sowie 62—66.

Die beim Verdampfen der Eluate 1—3 hinterbleibende Fraktion B, ein gelber, an der Luft schnell Kohlendioxyd aufnehmender Sirup, war papierchromatographisch nicht einheitlich.

Innerhalb einer verwaschenen, ninhydrinpositiven Zone lagen dicht beieinander zwei ausgeprägte Flecke. Mit Eisen(III)-cyanid/Nitrosylprussiat positiv reagierende Zonen waren im Chromatogramm nicht vorhanden.

Ein Teil der Fraktion B wurde 24 Std. mit 20-proz. Salzsäure auf 110° erhitzt. Im Rückstand der Reaktionslösung war papierchromatographisch nur β -Lysin nachzuweisen. Nach Zugabe von überschüss. Magnesiumoxyd entwickelte das Hydrolysat Ammoniak (nachgewiesen mit pH -Papier).

Zur Partialhydrolyse wurde Fraktion B 25 Min. mit 20-proz. Salzsäure gekocht. Das Papierchromatogramm des Verdampfungsrückstandes zeigte vier ninhydrinpositive Zonen mit den R_F -Werten des β -Lysins und der Abbauprodukte S_0 , S_1 und S_2 . Nach Zugabe von Magnesiumoxyd entwickelte das Partialhydrolysat Ammoniak. Mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid gab das Chromatogramm des Total- und Partialhydrolysates von B keine farbigen Zonen.

Abtrennung des Umwandlungsproduktes A

a) *Analytische Ringchromatographie*: 12cm einer 20-proz. wäßrigen Geomycin-hydrochlorid-Lösung wurden gleichmäßig auf den Startkreis (Durchm. 3cm) eines Viertel-Filtrierpapierbogens verteilt. Zentrum des Startkreises war ein Loch von 1 cm Durchm., durch das ein durch Aufrollen hergestellter Papierdocht gesteckt wurde. Er tauchte in eine Schale mit Pyridin/Butanol/Eisessig/Wasser (5:8:8:6). Kurz bevor die Lösungsmittelfront die Exsikkatorwand erreicht hatte, trocknete man den Bogen an der Luft, schnitt zwei radiale Streifen für den Antibioticum-Plattentest mit *B. subtilis* heraus, besprühte den übrigen Bogen mit Ninhydrinlösung und erhitze 10 Min. auf 110°. Dabei wurden zwei gleich starke, verwaschene Zonen mit den R_F -Werten 0.30 und 0.42 sichtbar, von denen laut Plattentest nur die äußere antibiotisch wirksame Substanz enthielt. Ein Versuch mit Roh-Geomycinsulfat lieferte das gleiche Ergebnis, nur war die Intensität der inneren Zone etwas geringer als die der äußeren.

b) *Präparative Ringchromatographie*: Eine Lösung von 510mg Geomycin-hydrochlorid in 2.5ccm Wasser wurde gleichmäßig auf die Startkreise von 210 Viertel-Filtrierpapierbogen verteilt, die man in drei Packs zu je siebenzig Bogen in der gleichen Weise wie beim vorstehend beschriebenen analytischen Verfahren entwickelte. Jeder zehnte Bogen aus jedem Pack wurde in der üblichen Weise mit Ninhydrin behandelt und diente als „Schnittmusterbogen“, nach dem die beiden Zonen aus den darüber liegenden neun Bogen ausgeschnitten wurden. Die Wasser-Eluate der beiden Zonen hinterließen beim Verdampfen i. Vak. gelbliche, sirupöse Rückstände (63mg aus der inneren, 128mg aus der äußeren Zone), die sich bei papierchromatographischer Prüfung als einheitlich erwiesen. Der Inhaltsstoff der äußeren Zone (Geomycin) hemmte das Wachstum unseres *St. aureus*-Stammes bis zur Verdünnung 1:2 $\times 10^6$. Der Inhaltsstoff der inneren Zone (Umwandlungsprodukt A) war unwirksam.

Lösungen der beiden Fraktionen in 20-proz. Salzsäure wurden nach 4stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur i. Vak. über Natriumhydroxyd verdampft und, wie oben beschrieben, im Ringchromatogramm untersucht. Das Geomycin war quantitativ in Umwandlungsprodukt A übergegangen. Andere Hydrolysenprodukte (einschließlich Kohlendioxyd und Ammoniak) waren nicht nachzuweisen. Das Umwandlungsprodukt A war dem Chromatogramm nach unverändert geblieben.

DNP-Geomycin: Eine Mischung von 186mg Geomycin-hydrochlorid, 3g Natriumhydrogencarbonat, 1.2g 2,4-Dinitro-fluorbenzol und 40ccm absol. Methanol wurde 24 Std. geschüttelt. Nachdem das Ungelöste abfiltriert, mit absol. Methanol gewaschen und erschöpfend mit Äther extrahiert worden war, suspendierte man es in 30ccm Wasser und versetzte bis zur sauren Reaktion mit konz. Salzsäure. Das zurückbleibende DNP-Geomycin war nach Waschen mit n HCl, Methanol und Äther und Trocknen über Natriumhydroxyd ein gelbes Pulver.

Salzsäure-Hydrolyse von DNP-Geomycin: Eine Suspension von 52mg DNP-Geomycin in 3ccm 20-proz. Salzsäure wurde unter langsamem Durchleiten von Stickstoff 24 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Der das Reaktionsgefäß verlassende Stickstoff passierte eine Vorlage mit wäßr. Bariumhydroxyd, in der während der ersten Stunde Bariumcarbonat ausfiel. Die gelbe Reaktionslösung wurde i. Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand papierchromatographisch (Butanol/Eisessig/Wasser, 2:1:1) auf gleichem Bogen mit β -DNP- β -Lysin, DNP-Geamin (dargestellt nach der oben für Bis-DNP- β -Lysin angegebenen Vorschrift) und 2,4-Dinitranilin verglichen.

Kohlendioxyd-Bildung bei der Geomycin-Partialhydrolyse: Eine Lösung von 278 mg Geomycin-hydrochlorid (getrocknet i. Hochvak. bei 60°) in 10ccm Wasser wurde unter Durchleiten von Kohlendioxyd-freiem Stickstoff 26 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Der Stickstoff passierte nach Verlassen des Reaktionsgefäßes eine Vorlage mit 50ccm 0.3 *n* Ba(OH)₂, das sich nach 24 Stdn. nur leicht getrübt hatte. Auch als die Reaktionslösung nach Erkalten mit 10ccm konz. Salzsäure versetzt und 1 Stde. lang Stickstoff durch die Lösung geleitet wurde, blieb die Ba(OH)₂-Lösung praktisch unverändert. Sehr schnell dagegen fiel ein Niederschlag aus, als man das Reaktionsgemisch zum Sieden erhitzte. Nach 1 Stde. wurde die Vorlage gegen eine frisch mit wäßr. Bariumhydroxyd beschickte ausgetauscht, das ausgefallene Bariumcarbonat abfiltriert und mit überschüss. *n* HCl gegen Methylorange titriert. Gef.: 11.2mg CO₂ (4% des eingewogenen Geomycin-hydrochlorides). Als dann das Hydrolysat weiterhin 16 Stdn. zum Sieden erhitzt wurde, bildete sich in der Vorlage kein Bariumcarbonat mehr.

BERND EISTERT*), HORST ELIAS, EHRENFRIED KOSCH
und RUDOLF WOLLHEIM**)

Synthese und einige Umsetzungen des 2-Hydroxy-dimedons

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 23. September 1958)

2-Hydroxy-dimedon, dargestellt durch Hydrolyse des 2-Diazo-dimedons mit Schwefelsäure, besser unter Zusatz von Kupferpulver, erweist sich als ein *aci*-Redukton. Aus seiner Sublimierbarkeit und Löslichkeit in gesätt. Kohlenwasserstoffen wird auf eine Chelat-Struktur geschlossen. Es bildet eine 1:1-Kupferkomplexverbindung und wird durch diazotiertes Anilin in normaler „Diazo-Spaltung“ in das Mono-Phenylhydrazid der α -Oxo- γ,γ -dimethyl-adipinsäure umgewandelt; Dehydrierung liefert das 5.5-Dimethyl-cyclohexan-trion-(1.2.3)-hydrat.

Bei der Einwirkung von wäßriger Schwefelsäure auf α -Diazoketone erhält man bekanntlich unter hydrolytischer Abspaltung von N₂ die entsprechenden α -Ketole¹⁾

*) Neue Adresse: Institut für Organische Chemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

**) Aus den Diplomarbeiten R. WOLLHEIM (Darmstadt 1955) und H. ELIAS (Darmstadt 1957) sowie der Dissertat. E. KOSCH (Darmstadt 1958).

¹⁾ F. ARNDT und J. AMENDE, Ber. dtsh. chem. Ges. **61**, 1124 [1928].