

LEOPOLD ETTLINGER, ERNST GÄUMANN, RALF HÜTTER,  
WALTER KELLER-SCHIERLEIN,  
FRIEDRICH KRADOLFER, LUCIEN NEIPP,  
VLADO PRELOG, PIERRE REUSSER und HANS ZÄHNER

Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, XVI<sup>1)</sup>

Cinerubine

Aus dem Forschungslaboratorium der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, dem Institut für spezielle Botanik und dem Organisch-chemischen Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

(Eingegangen am 12. März 1959)

Die von verschiedenen *Streptomyces*-Arten gleichzeitig gebildeten roten Antibiotica Cinerubin A und B geben bei der sauren Hydrolyse drei Zucker und ein Aglykon  $C_{22}H_{20}O_9$ . Für das letztere wurde auf Grund physikalischer Eigenschaften und chemischer Reaktionen die Teilformel I abgeleitet. Das Aglykon der Cinerubine ist mit dem inzwischen von H. BROCKMANN und Mitarbb. isolierten und in seiner Konstitution aufgeklärten  $\epsilon$ -Pyrrumycinon identisch \*).

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Stoffwechselprodukte von Actinomyceten fanden wir mehrere Streptomyceten-Stämme, welche rote, antibiotisch wirksame Verbindungen produzieren<sup>2)</sup>. Einige von diesen Farbstoffen ließen sich als die von BROCKMANN und Mitarbb.<sup>3a-h)</sup> beschriebenen Rhodomycine und Iso-rhodomycine identifizieren. Einige wenige von den isolierten Stämmen produzierten jedoch als Hauptprodukte zwei antibiotisch wirksame Farbstoffe, welche anscheinend bisher nicht beschrieben worden sind. Diese wurden von uns *Cinerubin A* und *B* genannt.

In einer früheren Mitteilung<sup>2)</sup> haben wir einen Cinerubin-Bildner, Stamm ETH. 6143, als Varietät von *S. cinereoruber* CORBAZ et al. beschrieben. Diese Art ist jedoch

\*) Wir danken Herrn Professor H. BROCKMANN für die freundliche Mitteilung seiner unveröffentlichten Ergebnisse. Einer von uns (V. P.) hatte weiter die Gelegenheit, am 6. Oktober 1958, im Rahmen des Sommerkurses über die Chemie der Naturstoffe in Varenna, einen ausführlichen Vortrag von Professor BROCKMANN über die Chemie der Pyrrumycinone zu hören. Bei diesem Anlaß wurde beschlossen, die Ergebnisse der beiden Forschungsgruppen gleichzeitig zu veröffentlichen (vgl. S. 1880, 1904 dieses Heftes).

<sup>1)</sup> XV. Mitteil.: W. KELLER-SCHIERLEIN, M. LJ. MIHAJLOVIĆ und V. PRELOG, *Helv. chim. Acta* **42**, 305 [1959].

<sup>2)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER, *Arch. Mikrobiol.* **25**, 325 [1957].

<sup>3)</sup> a) H. BROCKMANN und K. BAUER, *Naturwissenschaften* **37**, 492 [1952]. b) H. BROCKMANN, K. BAUER und I. BORCHERS, *Chem. Ber.* **84**, 700 [1951]. c) H. BROCKMANN und I. BORCHERS, *Chem. Ber.* **86**, 261 [1953]. d) H. BROCKMANN und B. PATT, *Naturwissenschaften* **40**, 221 [1953]. e) H. BROCKMANN und B. PATT, *Chem. Ber.* **88**, 1455 [1955]. f) H. BROCKMANN und B. FRANCK, *Chem. Ber.* **88**, 1792 [1955]. g) H. BROCKMANN und E. SPOHLER, *Naturwissenschaften* **42**, 154 [1955]. h) H. BROCKMANN und P. BOLDT, *Naturwissenschaften* **44**, 616 [1957].

nach ETTLINGER und Mitarbb.<sup>4)</sup> mit der Art *S. antibioticus* (WAKSMAN et WOODRUFF) WAKSMAN et HENRICI zu vereinigen, deren andere Stämme Actinomycine produzieren. Seither haben wir weitere Cinerubin-Bildner — *S. galilaeus*, ETTLINGER et al. und *S. niveoruber*, ETTLINGER et al. — gefunden, die sich in ihren systematischen Merkmalen<sup>5)</sup> vom Stamm ETH. 6143 unterscheiden. Tab. 1 zeigt die von uns untersuchten Cinerubin und Rhodomycin bildenden *Streptomyces*-Arten mit ihren artbestimmenden Merkmalen.

Tab. 1. Cinerubin und Rhodomycin bildende *Streptomyces*-Arten

	Sporen	Farbe des Luftmycels	Morphologie des Luftmycels	Melanoides Pigment	Farbe des vegetativen Mycels
<b>Cinerubin</b>					
<i>S. antibioticus</i> 2, 4) Stamm ETH. 6143	glatt	aschgrau	monopodial verzweigte Sporenketten ohne Spiralen	+	blaßkarminrot
<i>S. galilaeus</i> 4)	glatt	aschgrau	monopodial verzweigte Sporenketten, Seitenketten in offenen Spiralen	+	blaßkarminrot
<i>S. niveoruber</i> 4)	glatt	weiß	monopodial verzweigte Sporenketten, Seitenketten in offenen Spiralen	—	blaßkarminrot
<b>Rhodomycin</b>					
<i>S. purpurascens</i> 2, 6)	stachlig	weiß	Sporenketten als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen, in offenen kurzen Spiralen	+	blaßkarminrot
<i>S. antibioticus</i> 2, 4) Stamm ETH. 7451 und andere	glatt	aschgrau	monopodial verzweigte Sporenketten ohne Spiralen	+	blaßkarminrot

Das Verhältnis der beiden Cinerubine in den Kulturbrühen läßt sich durch die Zusammensetzung der Nährlösung beeinflussen. Eine Sojamehl-Nährlösung, welche Mannit enthält, liefert das Cinerubin A im Überschuß, während eine ähnliche Nährlösung mit Glycerin als Kohlenstoffquelle die Entstehung von Cinerubin B begünstigt.

Die Cinerubine unterscheiden sich papierchromatographisch und lassen sich präparativ durch CRAIG-Verteilung mit einem Tetrachlorkohlenstoff/Methanol/Wasser-System trennen. Zur präparativen Herstellung werden am besten aus den Äthylacetat-Extrakten von Kulturen, die auf einer geeigneten Nährlösung gezüchtet worden sind, durch Ausschütteln mit einer verdünnten Säure die Basen isoliert und diese einer Craig-Verteilung unterworfen.

Die reinen Cinerubine stellen isomere rote Basen dar, deren analytische Daten mit den Formeln  $C_{44}H_{59}NO_{18} \pm CH_2$  übereinstimmen. Berechnet auf diese Formeln weisen die beiden Cinerubine 1  $OCH_3$ , 2  $(N)CH_3$  und mindestens 4  $(C)CH_3$ -Gruppen auf. Die Dissoziationskonstanten, die wegen der Schwerlöslichkeit in anderen Lösungsmitteln in Dimethylsulfoxyd bestimmt wurden, sind deutlich verschieden:

4) L. ETTLINGER, R. CORBAZ und R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. 31, 326 [1958].

5) Das „Subcommittee on the Taxonomy of the Actinomycetales“ (Vorsitzender Prof. D. GOTTLIEB) empfiehlt die folgenden fünf Merkmale: 1. Morphologie der Sporenketten, 2. Farbe des Luftmycels, 3. Morphologie der Sporen im Elektronenmikroskop, 4. Farbe des vegetativen Mycels und 5. Melaninbildung.

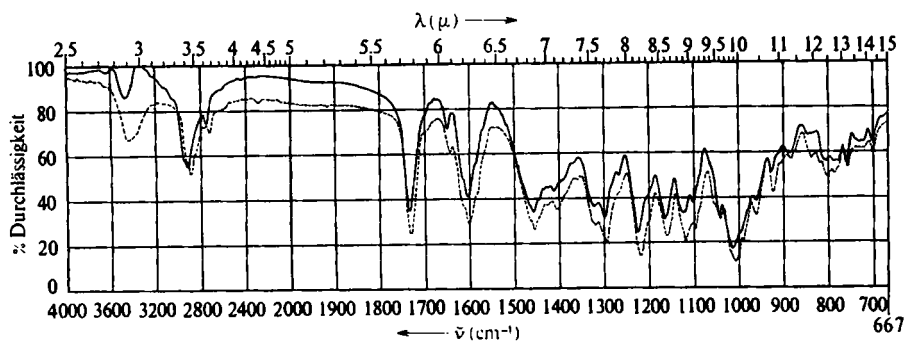
6) W. LINDENBEIN, Arch. Mikrobiol. 17, 361 [1952].

$p_{KDSO}^*$  Cinerubin A = 7.95,  $p_{KDSO}^*$  Cinerubin B = 7.18; die gleichzeitig bestimmten Äquivalentgewichte waren dagegen praktisch gleich, 873 bzw.  $878 \pm 35$ <sup>7)</sup>.

Die Absorptionsspektren im UV und Sichtbaren der beiden Cinerubine sind deckungsgleich und lassen vermuten, daß es sich um Polyhydroxy-anthrachinon-Derivate handelt. Sie unterscheiden sich nur wenig von den Absorptionsspektren des 1.4.5-Trihydroxy-anthrachinons<sup>3f)</sup> (vgl. Tab. 2). Die in KBr aufgenommenen IR-

Tab. 2. UV-Absorptionsspektren, Spektren im Sichtbaren

Verbindung	Lösungsmittel	Wellenlänge $m\mu$ (log $\epsilon$ )
Cinerubin A (875.9)	96-proz. Äthanol	235 (4.75), 259 (4.42), 294 (4.00), 473 (4.13), 487 (4.19), 497 (4.22), 518 (4.10), 533 (4.04)
	Pyroboracetat in Acetanhydrid	kalt unlöslich nach Erwärmen 508, 545, 588 (rotviolett)
Cinerubin B (875.9)	96-proz. Äthanol	235 (4.73), 258 (4.40), 294 (3.98), 473 (4.12), 488 (4.18), 497 (4.21), 519 (4.11), 432 (4.05)
	Pyroboracetat in Acetanhydrid	kalt 550, 595 (rotviolett) nach Erwärmen 508, 545, 589 (rotviolett)
Aglykon $C_{22}H_{20}O_9$	96-proz. Äthanol	235 (4.69), 258 (4.38), 292 – 296 (3.93), 470 (4.08), 485 (4.15), 497 (4.19), 517 (4.07), 531 (4.00)
	Pyroboracetat in Acetanhydrid	kalt 548, 594 (rotviolett) nach Erwärmen 505, 539, 583 (rotviolett)
Bis-anhydro- aglykon $C_{22}H_{16}O_7$	96-proz. Äthanol	251 (4.68), 274 (4.53), 310 (4.08), 486 (4.22), 495 (4.25), 519 (4.27), 529 (4.24), 556 (3.68), 569 (3.76)
	Pyroboracetat in Acetanhydrid	kalt 456, 528, 568, 620 (blauviolett) nach Erwärmen 468, 503, 544, 588 (rotviolett)
1.4.5-Tri- hydroxy- anthrachinon	Methanol <sup>3f)</sup>	229 (4.57), 250 (4.27), 282 (3.91), 457 (3.99), 490 (4.05), 510 (3.91), 525 (3.74)
	Pyroboracetat in Acetanhydrid <sup>3f)</sup>	kalt 545, 592 (rotviolett) nach Erwärmen 536, 583 (rotviolett)



IR-Spektren von Cinerubin A (—) und von Cinerubin B (----) (fest in KBr)

Absorptionsspektren (vgl. Abbild.) zeigen nur ganz geringe Unterschiede im „finger-print“-Gebiet. Im  $6\mu$ -Gebiet findet man in beiden Spektren die gleichen Banden bei  $5.73\mu$  (Zuordnung  $CH_3OOC$ - s. später),  $6.06\mu$  und  $6.23\mu$ . Diese zwei letzteren

<sup>7)</sup> Methodik nach W. SIMON, E. KOVÁTS, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN und E. HEILBRONNER, Helv. chim. Acta 37, 1872 [1954], sowie W. SIMON und E. HEILBRONNER, Helv. chim. Acta 40, 210 [1957].

Banden sind einem, wenigstens dreimal in *peri*-Stellung zum Chinon-System hydroxylierten Anthrachinon zuzuschreiben<sup>8)</sup>.

Durch Verseifung mit verdünnter Schwefelsäure liefern die beiden Cinerubine das gleiche wasser-unlösliche rote Aglykon, aber ein verschiedenes *Zucker-Gemisch*.

Die papierchromatographische Untersuchung des letzteren zeigt, daß es aus drei Komponenten besteht. Zwei von diesen Komponenten besitzen bei beiden Cinerubinen die gleichen  $R_F$ -Werte und sind wahrscheinlich identisch, die dritte mit dem höchsten  $R_F$ -Wert ist dagegen verschieden. Sie besitzt bei Cinerubin A einen etwas höheren  $R_F$ -Wert als bei Cinerubin B. Einer der Zucker ist offenbar ein Dimethylamino-Zucker vom Typus des Rhodosamins<sup>3f, 3g)</sup> oder Desosamins<sup>9a, 9b)</sup> und ist für die basische Natur der Cinerubine verantwortlich. Auf Grund von analytischen Daten muß man annehmen, daß in den beiden anderen übrigbleibenden Zuckern wenigstens 2 (C)CH<sub>3</sub> vorliegen. Wir werden über den Zucker-Anteil der Cinerubine später berichten, wenn die Untersuchungen weiter fortgeschritten sind.

Das farbige *Aglykon* der Cinerubine ist eine stickstofffreie Verbindung von der elementaren Zusammensetzung C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>. Es läßt sich darin eine CH<sub>3</sub>O-Gruppe nachweisen, die — wie später gezeigt wird — einer Carbomethoxy-Gruppe angehört. Das Aglykon enthält weiter 5 Hydroxyle, von welchen vier mit Acetanhydrid und Pyridin bei Raumtemperatur acetylierbar sind. Sowohl das IR-Absorptionsspektrum mit den Chinon-Banden bei 6.16, 6.23 und 6.26  $\mu$  als auch die Absorptionsspektren im UV und im Sichtbaren weisen darauf hin, daß es sich um ein 1.4.5-Trihydroxy-anthrachinon-Derivat handelt. Die Absorptionsspektren im UV und im Sichtbaren sind praktisch identisch mit denjenigen der Cinerubine (vgl. Tab. 2), woraus man schließen kann, daß die Zucker-Reste nicht direkt am Anthrachinon-Anteil sitzen.

Für eine 1.4.5-Trihydroxy-anthrachinon-Teilstruktur des Aglykons sprechen neben den Absorptionsspektren auch die folgenden Versuche:

a) Das Aglykon zeigt bei der Behandlung mit Pyroboracetat und Acetanhydrid in der Kälte eine für 1.5-Dihydroxy-anthrachinone typische bathochrome Verschiebung der Banden im Sichtbaren (vgl. Tab. 2), welche auf die Bildung eines Diborsäure-Derivates zurückzuführen ist. Die hypsochrome Verschiebung nach dem Erwärmen auf 100° wird durch die nachträgliche Acetylierung eines weiteren Hydroxyls in *peri*-Stellung zum Chinon-Carbonyl erklärt<sup>3f)</sup>.

b) Die reduzierende Acetylierung des Tetraacetylglukons nach H. BROCKMANN und G. BUDDE<sup>10)</sup> liefert ein Produkt mit einem typischen Anthracen-Spektrum.

Die papierchromatographische Untersuchung der durch Oxydation des Aglykons mit Chrom(VI)-oxyd nach KUHN-ROTH erhaltenen flüchtigen Säuren zeigte, daß es sich um ein Gemisch von Propionsäure und Essigsäure handelt. Man kann daraus schließen, daß die im Aglykon nach KUHN-ROTH nachweisbare eine (C)CH<sub>3</sub>-Gruppe einem Äthyl-Rest angehört.

<sup>8)</sup> a) M. S. C. FLETT, J. chem. Soc. [London] 1948, 1441. b) M.-L. JOSIEN, N. FUSON, J. M. LEBAS und T. M. GREGORY, J. chem. Physics 21, 331 [1953]. c) Zusammenfassende Darstellung von R. NORMAN JONES und C. SANDOREY in W. WEST, Chemical Applications of Spectroscopy, Interscience Publishers, New York 1956, S. 491.

<sup>9)</sup> a) E. H. FLYNN, M. V. SIGAL, P. F. WILEY und K. GERZON, J. Amer. chem. Soc. 76, 3121 [1954]. b) H. BROCKMANN, H. KÖNIG und R. OSTER, Chem. Ber. 87, 856 [1954].

<sup>10)</sup> Chem. Ber. 86, 432 [1953].

Durch Sublimation im Vakuum geht das Aglykon unter Verlust von zwei Moll. Wasser in ein *Bis-anhydro-aglykon*  $C_{22}H_{16}O_7$  über, dessen UV-Absorptionsspektrum gegenüber demjenigen des Aglykons um etwa 15 m $\mu$  bathochrom verschoben ist (vgl. Tab. 2). Das Bis-anhydro-aglykon enthält noch drei Hydroxy-Gruppen, welche mit Acetanhydrid/Pyridin unter Entstehung eines kristallinen Triacetyl-Derivates bei Raumtemperatur acetylierbar sind. Das Absorptionsspektrum des letzteren im UV und im Sichtbaren zeigt eine große Ähnlichkeit mit demjenigen des Tetracenchinons. Die Tetracenchinon-Teilstruktur des Bis-anhydro-aglykons wurde durch die reduzierende Acetylierung seines Triacetyl-Derivates bestätigt, welche ein Produkt mit einem typischen Tetracen-Spektrum liefert. Für eine 1.4.5-Stellung der Hydroxyle im Bis-anhydro-aglykon spricht die Behandlung mit Pyroboracetat, welche in der Kälte zu einer stark bathochromen Verschiebung der Banden im Sichtbaren führt, auf welche beim Erwärmen eine hypsochrome folgt.

Die alkalische Verseifung des Aglykons liefert eine Carbonsäure, die sich ihrem Absorptionsspektrum nach nicht vom Aglykon selbst, sondern vom Bis-anhydro-aglykon ableitet. Dies wurde durch Veresterung der Carbonsäure mit Methanol und Schwefelsäure bestätigt, welche das Bis-anhydro-aglykon zurückliefert. Die Carbonsäure kann relativ leicht durch Erhitzen mit Kupfer in Chinolin decarboxyliert werden unter Entstehung eines kristallinen *Des-carbomethoxy-bis-anhydro-aglykons*. Die Absorptionsspektren des Decarboxylierungsproduktes und seines kristallinen Triacetyl-Derivates bestätigen die Tetracenchinon-Teilstruktur des Bis-anhydro-aglykons.

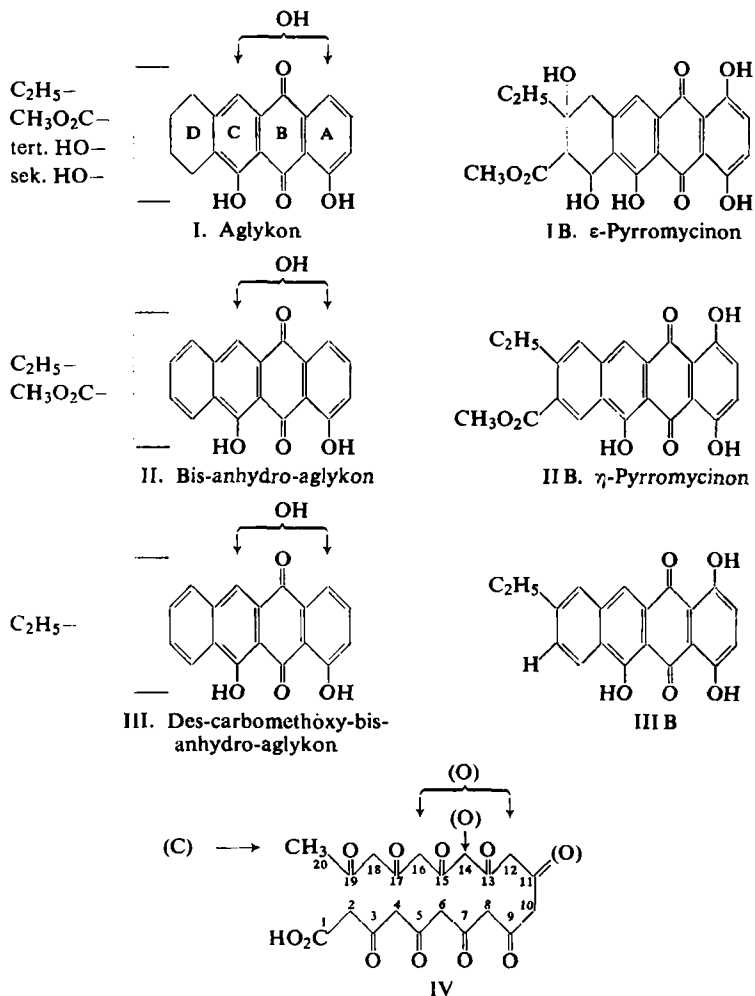
Das Aglykon der Cinerubine stellt somit ein Pentahydroxy-tetrahydro-tetracenchinon-Derivat dar mit drei Hydroxylgruppen in *peri*-Stellung zu Chinon-Carbonylen und mit zwei Hydroxy-Gruppen im Ring D (vgl. Formel I). Dieser letztere wird leicht durch Abspaltung von 2 Moll. Wasser zu einem Trihydroxy-tetracenchinon-Derivat — dem Bis-anhydro-aglykon — aromatisiert. In beiden Verbindungen, dem Aglykon und im Bis-anhydro-aglykon, liegen noch — allem Anschein nach — im Ring D eine Äthyl- und eine Carbomethoxy-Gruppe vor. Man kann somit auf Grund unserer Ergebnisse für das Aglykon die Teilstruktur I und für das Bis-anhydro-aglykon die Teilstruktur II schreiben. Das Des-carbomethoxy-bis-anhydro-aglykon besitzt demnach die Teilstruktur III.

In diesem Stadium der Untersuchung, die aus äußeren Gründen für einige Zeit unterbrochen werden mußte, erschien die Mitteilung von H. BROCKMANN, L. COSTA PLÀ und W. LENK<sup>11)</sup> über das  $\gamma$ -Pyrrormycinon, welche einen Vergleich dieser Verbindung mit unserem Bis-anhydro-aglykon anregte. Beide Verbindungen erwiesen sich als identisch. Ein in Göttingen durchgeführter papierchromatographischer Vergleich zeigte weiter, daß unser Aglykon mit dem inzwischen in Göttingen isolierten und noch nicht beschriebenen  $\epsilon$ -Pyrrormycinon identisch ist. Die Cinerubine A und B waren dagegen eindeutig verschieden von dem inzwischen in Göttingen erhaltenen Pyrrormycin, welches ein Glykosid des  $\epsilon$ -Pyrrormycinons mit dem Dimethylamino-Zucker Rhodosamin darstellt<sup>12)</sup>.

<sup>11)</sup> Angew. Chem. 69, 477 [1957].

<sup>12)</sup> H. BROCKMANN und W. LENK, Chem. Ber. 92, 1880, 1904 [1959], nachstehend; vgl. auch Anm. \*), S. 1867.

Da die Untersuchungen der Göttinger Schule über Pyrromycinone besonders in bezug auf die genaue Lokalisierung der Substituenten am Tetracenchinon-Gerüst viel weiter fortgeschritten waren als unsere eigenen, erübrigte sich von unserer Seite eine weitere Untersuchung des Aglykons der Cinerubine. Dieses ( $\epsilon$ -Pyrromycinon) besitzt nach H. BROCKMANN und Mitarbb. die Formel IB, das Bis-anhydro-aglykon ( $\eta$ -Pyrromycinon) die Formel IIB und das Des-carbomethoxy-bis-anhydro-aglykon die Formel IIIB in bester Übereinstimmung mit unseren Teilformeln I, II und III<sup>12)</sup>.



Die Lokalisierung der Substituenten am Tetracenchinon-Gerüst durch die Göttinger Forscher bildet eine sehr schöne Bestätigung der biogenetischen Anschauungen von A. J. BIRCH<sup>13)</sup> über die Entstehung solcher Verbindungen aus Acetat-Ionen über

<sup>13)</sup> Vgl. die zusammenfassende Darstellung von A. J. BIRCH in L. ZECHMEISTER, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] 14, 186 [1957].

Vorstufen wie z. B. IV. C-20 wird dabei wahrscheinlich durch eine Einkohlenstoff-Quelle wie z. B. Methionin methyliert.

Die Anwendung biogenetischer Hypothesen erleichtert in dieser Verbindungsreihe bedeutend die Konstitutionsaufklärung, indem sie die arbeitshypothetische Lokalisierung der Substituenten ermöglicht. Wie die Untersuchungen von BROCKMANN und Mitarbb. zeigen, hätte man auf Grund der biogenetischen Hypothesen und der von uns gesammelten wenigen Daten alle Substituenten im Aglykon der Cinerubine richtig lokalisieren können bis auf die Stellung einer einzigen „nachträglich eingeführten“ Hydroxy-Gruppe. Für diese blieb die Alternative C-12, C-16 übrig. Da bei natürlichen Anthrachinon-Derivaten<sup>14)</sup> (wie z. B. Helminthosporin, Islandicin, Cynodontin, Catenarin, Tritisporin, Erythroglaucon, Emodin, Physcion usw.) das eine oder andere oder sogar die beiden analogen Kohlenstoffatome durch Hydroxyle besetzt sind, war es nicht möglich, einer von diesen Stellungen den Vorzug zu geben.

Besonders bemerkenswert scheint uns, daß zwei auf den ersten Blick so verschiedene Gruppen von Verbindungen, wie die durch Mikroorganismen produzierten Naphthochinon-, Anthrachinon- und Tetracenchinon-Derivate (z. B. Actinorhodin, Granaticin, Pyrromycine und Pyrromycinone, Cinerubine, Rhodomycine und Rhodomycinone sowie Isorhodomycine und Isorhodomycinone) einerseits und Makrolide<sup>15)</sup> (z. B. Pikromycin, Methymycin, Neomethymycin, Narbomycin, Erythromycine und Magnamycine) andererseits allem Anschein nach aus ähnlichen oder sogar gleichen biogenetischen Vorstufen entstehen.

Da die transanularen Kondensationen aus sterischen Gründen besonders leicht verlaufen, wäre es gut möglich, daß die vielgliedrigen Poly-oxo-lactone energetisch sehr günstige Zwischenprodukte für polycyclische aromatische Systeme darstellen, so daß die Bildung des vielgliedrigen Lacton-Ringes eine wichtige biogenetische Vorstufe bei der Entstehung solcher Systeme wäre. Eine Methylierung der reaktiven Methylen-Gruppen ist dagegen aus sterischen und elektronischen Gründen für die transanularen Kondensationen, die aromatische Systeme liefern, ungünstig; sie führt deshalb zu Makroliden und ist für diese typisch.

Es sei bei dieser Gelegenheit auch auf die Verwandtschaft der bei beiden Gruppen vorkommenden Zucker hingewiesen (Desosamin-Rhodosamin).

Zum Schluß sei noch kurz zusammenfassend auf die biologische Wirksamkeit der Cinerubine hingewiesen. Sie zeigen teilweise bemerkenswerte antibiotische Wirksamkeit. In vitro wurde Hemmung bei folgenden Konzentrationen in  $\mu\text{g/ccm}$  beobachtet: *Bacillus megatherium*, A 0.1, B 1; *Corynebacterium diphtheriae*, A 0.001, B 0.1; *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, A und B 10, *Streptococcus faecalis*, A 1, B 10; *Streptococcus mitis* A und B 0.01; *Streptococcus pyogenes*, A 0.1, B 1; *Endomyces albicans*, A 0.1, B 1; *Candida vulgaris* A 0.1, B 1; *Mycobacterium Tbc* A 1, B 10. *Pasteurella pestis*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhosa* waren dagegen mit 100  $\mu\text{g/ccm}$  nicht zu hemmen. Protozoen, wie *Entamoeba histolytica* wurden in dieser Grenzkonzentration abgetötet.

Darüber hinaus besitzen die Cinerubine auch cytostatische Eigenschaften. Sie verändern bei Testierung in vitro an Hühnerfibroblasten-Kulturen schon in den niedrigen Dosen von 1 bis 0.01  $\mu\text{g/ccm}$  das morphologische Aussehen der Nucleoli und den

<sup>14)</sup> Vgl. R. H. THOMPSON, Naturally Occuring Quinones, Butterworths, Sci. Publ., London 1957.

<sup>15)</sup> R. B. WOODWARD, Angew. Chem. 69, 50 [1957].

Zellteilungsvorgang. Im Bereiche der cytologische Veränderungen verursachenden Konzentrationen sind die Bedingungen für eine Virusvermehrung verändert, indem Influenzavirus (PR 8) auf isolierten Chorioallantois-Membranen von Bruteiern in Gegenwart von Cinerubin A oder B (0.1  $\mu\text{g/ccm}$ ) sich nicht vermehrt. Ferner wird das Wachstum verschiedener experimenteller, überimpfbarer Tumoren (CROCKER-Sarkom 180, EHRLICH-Carcinom (solide Form), Adeno-Carcinom EO-771, WALKER-Carcinosarkom 256) gehemmt. Cinerubin A ist wirksamer als Cinerubin B und hemmt auch das Uterus Epitheliom T-8 GUÉRIN und das FLEXNER-JOBLIN-Carcinom<sup>16)</sup>. Bei den Ratten und der Maus sind beide Verbindungen sehr giftig; ihre Wirkung auf Tiertumoren kann kaum als spezifisch angesehen werden<sup>17)</sup>.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE<sup>18)</sup>

*Cinerubine bildende Stämme:* *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN et WOODRUFF) WAKSMAN et HENRICI: Stamm ETH. 6143 isoliert aus einer Erdprobe vom Zoologischen Garten in Zürich. *Streptomyces galilaeus* ETTLINGER et al.: Stamm ETH. 10908 aus einer Erdprobe von Newi Yusha, Israel, Stamm ETH. 19361 aus einer Erdprobe von Horsham, England. Die beiden Stämme stimmen in allen für die Systematik im Vordergrund stehenden Merkmalen<sup>5)</sup> mit dem von L. ETTLINGER und Mitarbb.<sup>4)</sup> beschriebenen Typus-Stamm ETH. 18822 von *Streptomyces galilaeus* überein. *Streptomyces niveoruber* ETTLINGER et al.: Stamm ETH. 17403 aus einer Erdprobe von Marzell, Deutschland, und Stamm ETH. 17860 aus einer Erdprobe von Pyewipe-Grimsby, England. Die beiden Stämme sind gleich, wobei der Stamm ETH. 17860 Typus-Stamm für *Streptomyces niveoruber* ist.

*Züchtung:* Für die Produktion der Cinerubine wurde der Stamm ETH. 6143 bei 27° auf einer der folgenden Nährlösungen gezüchtet<sup>19)</sup>: Für die Produktion von Cinerubin A günstige Nährlösung: 20 g Sojamehl, 20 g Mannit, 1000 ccm Leitungswasser. Für die Produktion von Cinerubin B günstige Nährlösung: 10 g Sojamehl, 20 g Glycerin, 5 g Natriumchlorid, 10 g Calciumhydroxyd, 1 g Natriumnitrat, 1000 ccm Leitungswasser. Beide Nährlösungen wurden durch Zugabe von Kalilauge auf  $p_{\text{H}}$  7.8 eingestellt und anschließend 30 Min. bei 1 atü sterilisiert.

*Isolierung des rohen Cinerubin-Gemisches:* 3000 l Kultur wurden unter Zusatz von Hyflo-Supercel filtriert, auf  $p_{\text{H}}$  8.5 eingestellt und mit Äthylacetat extrahiert. Die Filterkuchen wurden zweimal mit Aceton angerührt und der Brei über Hyflo-Supercel filtriert. Die Aceton-Auszüge wurden im Umlaufverdampfer eingedampft und der wäbr. Rückstand mit Äthylacetat ausgezogen. Die vereinigten Äthylacetat-Auszüge aus dem Mycel und Kulturfiltrat engte man im Umlaufverdampfer auf etwa 10 l ein und extrahierte aus der eingeeengten Lösung die Basen mit verd. Essigsäure. Die essigsauren Extrakte wurden mit Lauge auf  $p_{\text{H}}$  9 gebracht und mit Chloroform ausgezogen. Zu der auf etwa 1 l eingeeengten Chloroform-Lösung gab man langsam tropfenweise 2.5 l Petroläther, wobei ein hellroter Niederschlag ausfiel, der mit Petroläther gewaschen und bei 30° getrocknet wurde; Ausb. 39.9 g.

<sup>16)</sup> P. LOUSTALOT, P. A. DESAULLES und R. MEIER, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1958 (im Druck).

<sup>17)</sup> Frau Dr. B. SCHÄR und Hrn. Dr. P. LOUSTALOT von der CIBA Aktiengesellschaft in Basel danken wir für die Mitteilung der Ergebnisse ihrer Untersuchungen.

<sup>18)</sup> Alle Schmp. sind korrigiert. Die Absorptionsspektren im UV und im Sichtbaren wurden mit einem Beckman-Spektrographen Modell DK 1, die IR-Absorptionsspektren mit dem Perkin-Elmer Doppelstrahl-Spektrographen Modell 21, aufgenommen.

<sup>19)</sup> Über die Technik der Züchtung vgl. Helv. chim. Acta 38, 935 [1955].



**Papierchromatographie:** Zur papierchromatographischen Trennung und Charakterisierung der Cinerubine verwendeten wir Rundfilterchromatographie. Das Filterpapier (WHATMAN No. 1) wurde mit einer 20-proz. Lösung von Formamid in Aceton getränkt und 8–10 Min. an der Luft getrocknet. Als mobile Phase kam ein Gemisch von 2 Vol.-Tln. Benzol und 1 Vol.-Tl. Cyclohexan zur Anwendung, das mit Formamid gesättigt war. Da die Lösungsmittelfront schlecht erkennbar war, wurde auf die Bestimmung von  $R_F$ -Werten verzichtet und statt dessen das Verhältnis der Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Aglykons der Cinerubine als  $R_E = 1$  definiert. Cinerubin A besitzt ein  $R_E = 0.45$ , Cinerubin B ein  $R_E = 0.89$ . Neben diesen Hauptprodukten wurden in Kulturextrakten durch Papierchromatographie mehrere Nebenprodukte festgestellt, welche wir nicht weiter untersuchten. Die Hauptkomponenten eines Rhodomycin-Gemisches bleiben unter den gleichen Bedingungen am Startort zurück; die am schnellsten wandernde Nebenkomponente wies ein  $R_E = 0.3$  auf.

**Cinerubin A:** Das reine Cinerubin A erhielt man durch eine Craig-Verteilung von Rohbasen, die von einer Kultur auf Sojamehl-Mannit-Nährlösung stammten. Als Lösungsmittelsystem diente ein Gemisch aus 7.5 l Tetrachlorkohlenstoff, 6.375 l Methanol und 1.125 l Wasser. Die Verteilung wurde in einer vollautomatischen 200stufigen Apparatur<sup>20)</sup> durchgeführt. 15.13 g Rohbasen füllte man in die ersten 8 Gläser ein, worauf die Verteilung über 310 Stufen mit einseitiger Entnahme der oberen Phase vorgenommen wurde. Die zusammengehörenden Fraktionen wurden nach der Verteilung vereinigt, mit Wasser versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden getrocknet und i. Vak. eingedampft. Die Fraktionen 14–45 (1.81 g) bildeten eine amorphe rote Masse, aus der durch Kristallisation aus Benzol/Methanol 150 mg reines Cinerubin B erhalten werden konnten. Die roten, amorphen Fraktionen 51–90 (4.265 g) stellten ein papierchromatographisch nahezu einheitliches rohes Cinerubin A dar. In den Fraktionen 91–310 waren Nebenkomponenten und Verunreinigungen angereichert. Durch saure Hydrolyse ließ sich daraus dasselbe Aglykon erhalten, wie aus den Cinerubinen A und B. Diese Fraktionen wurden deshalb zusammen mit den entsprechenden Fraktionen aus anderen Ansätzen zur Herstellung des Aglykons verwendet.

4.265 g rohes Cinerubin A und 3.071 g entsprechendes Material aus einem anderen Ansatz wurden nochmals mit dem gleichen Lösungsmittelsystem über 365 Stufen verteilt. Die Fraktionen 65–100 dieser zweiten Verteilung lieferten nach Kristallisation aus Benzol/Methanol 2.07 g kristallisiertes Cinerubin A, welches lösungsmittelhaltige Blättchen bildete, die beim Trocknen zu einem dunkelroten, mikrokristallinen Pulver zerfielen. Die Kristalle schmolzen unter dem Mikroskop bei 155–158°, um bei 160–180° wieder zu Nadelrosetten zu erstarren, welche langsam oberhalb von 249° wieder verschwanden.  $\rho_{K_{DSO}}^{\bullet} = 7.95^{71}$ .

$C_{43}H_{57}NO_{18}$  (875.9)

Ber. C 58.96 H 6.56 N 1.60  $OCH_3$  3.54 2 (N) $CH_3$  3.43 4 (C) $CH_3$  6.86 8 akt. H 0.92

$C_{45}H_{61}NO_{18}$  (904.0)

Ber. C 59.38 H 6.80 N 1.55  $OCH_3$  3.43 2 (N) $CH_3$  3.32 4 (C) $CH_3$  6.64 8 akt. H 0.88

Gef. C 59.18 H 6.76 N 1.55  $OCH_3$  3.99 (N) $CH_3$  3.04 (C) $CH_3$  6.38 akt. H 0.86

59.38 6.90 1.73 3.96

Äquiv.-Gew. 873

Absorptionsspektrum im UV und im Sichtbaren aufgenommen in 96-proz. Äthanol bzw. in Acetanhydrid unter Zusatz von Pyroboracetat<sup>3f)</sup> vgl. Tab. 2.

IR-Absorptionsspektrum in KBr : vgl. Abbild.

**Pikrat:** 70 mg Cinerubin A in 15 ccm heißem Alkohol wurden mit 75 mg Pikrinsäure in 3 ccm Alkohol versetzt, wobei 78 mg eines leuchtend roten flockigen Niederschlages ausfielen.

<sup>20)</sup> F. A. v. METZSCH, Chemie-Ing.-Techn. **25**, 66 [1953].

Durch Umlösen aus Chloroform/Alkohol wurden rote Kriställchen vom Schmp. 156–158° erhalten. Zur Analyse wurde bei 85° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{43}H_{57}NO_{18} \cdot C_6H_3N_3O_7$  (1105.0) Ber. C 53.26 H 5.47 N 5.07

$C_{45}H_{61}NO_{18} \cdot C_6H_3N_3O_7$  (1133.1) Ber. C 54.06 H 5.69 N 4.95 Gef. C 53.07 H 5.37 N 5.10

*Cinerubin B*: 16 g Rohbasen, die auf einer Glycerin-Nährlösung bereitet worden waren, wurden einer Craig-Verteilung über 300 Stufen mit dem gleichen Lösungsmittelsystem und auf gleiche Weise, wie bei der Herstellung von Cinerubin A beschrieben, unterworfen. Der amorphe rote Rückstand aus den Fraktionen 17–37 (6.9 g) wurde in 50 ccm heißem Benzol gelöst und in der Wärme mit etwa 10 ccm Methanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach dem Animpfen schied sich über Nacht bei 0° ein leuchtend roter Kristallbrei ab. Zur Analyse wurde dreimal aus Benzol/Methanol umgelöst und 24 Stdn. i. Hochvak. bei 90° getrocknet. Das Cinerubin B bildet feine orangerote Stäbchen, die unter dem Mikroskop zwischen 168 und 178° schmolzen, dann zu langen dünnen Nadeln wiedererstarren, um endgültig bei 240–243° zu zerfließen. In der Kapillare wurde ein unscharfer Schmp. bei etwa 180° beobachtet;  $\rho_{D_{20}}^{25} = 7.18^{71}$ .

$C_{43}H_{57}NO_{18}$  (875.9)

Ber. C 58.96 H 6.56 N 1.60  $OCH_3$  3.54 2 (N) $CH_3$  3.43 4 (C) $CH_3$  6.86 6 akt. H 0.69

$C_{45}H_{61}NO_{18}$  (904.0)

Ber. C 59.38 H 6.80 N 1.55  $OCH_3$  3.43 2 (N) $CH_3$  3.32 4 (C) $CH_3$  6.64 6 akt. H 0.69

Gef. C 59.42 H 6.50 N 1.55  $OCH_3$  4.22 (N) $CH_3$  3.15 (C) $CH_3$  6.38 akt. H 0.70

59.15 6.44 1.60 4.07 0.66

Äquiv.-Gew. 878

Absorptionsspektrum im UV und im Sichtbaren aufgenommen in 96-proz. Äthanol bzw. in Acetanhydrid unter Zusatz von Pyroboracetat vgl. Tab. 2.

IR-Absorptionsspektrum in KBr: vgl. Abbild.

*Papierchromatographischer Nachweis der Zucker*, die durch saure Hydrolyse der Cinerubine entstehen. Je 50 mg des Cinerubins wurden in 5 ccm 0.5 n  $H_2SO_4$  20 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Nach dem Erkalten filtrierte man vom ausgeschiedenen Aglykon ab und stellte das Filtrat mit gesätt. Bariumhydroxydlösung auf  $pH$  5 ein. Das ausgefallene Bariumsulfat wurde abzentrifugiert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Von einer Lösung des Rückstandes in 0.5 ccm Wasser wurden je 20  $\mu l$  mit dem Lösungsmittelsystem n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) papierchromatographiert. Nach der Entwicklung mit Anilin-phthalat in n-Butanol erschienen die Zucker als gelbe Flecke, die im UV hell fluoreszierten: Cinerubin A  $R_F$ : 0.03, 0.47, 0.75; Cinerubin B  $R_F$ : 0.03, 0.47, 0.62. Glucose besaß unter denselben Bedingungen den  $R_F$ -Wert 0.09. Mit Anilin/Diphenylamin/Phosphorsäure konnten nur die beiden rascher wandernden Zucker nachgewiesen werden, mit ammoniakalischer Silbernitratlösung kam dagegen der am raschesten wandernde Zucker kaum zum Vorschein.

*Aglykon  $C_{22}H_{20}O_9$  ( $\epsilon$ -Pyromycinon) (I)*: 50 mg des Cinerubins A bzw. B wurden mit 10 ccm n  $H_2SO_4$  20 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Das Aglykon schied sich dabei in roten Flocken aus, die in Äthylacetat aufgenommen wurden. Der Rückstand, welcher beim Eindampfen der gewaschenen und getrockneten Äthylacetat-Auszüge zurückblieb, kristallisierte aus Benzol/Methanol in leuchtend roten feinen Stäbchen, die bei etwa 190° schmolzen, nachher zu größeren Nadeln erstarrten, um bei etwa 234–238° endgültig zu schmelzen. Zur Analyse wurde 20 Stdn. i. Hochvak. bei 85° getrocknet.

$C_{22}H_{20}O_9$  (428.4) Ber. C 61.68 H 4.71  $OCH_3$  7.25 (C) $CH_3$  3.50 5 akt. H 1.17

Gef. C 62.48 H 4.90  $OCH_3$  7.27, 7.31 (C) $CH_3$  3.42 akt. H 1.26

Absorptionsspektrum im UV und im Sichtbaren aufgenommen in 96-proz. Äthanol bzw. in Acetanhydrid unter Zusatz von Pyroboracetat vgl. Tab. 2.

IR-Absorptionsspektrum in KBr: Banden bei 2.75, 3.22, 3.37, 5.78, 6.06, 6.18 (S), 6.24, 6.26 (S)  $\mu$ .

Ein im Göttinger Laboratorium durchgeführter papierchromatographischer Vergleich des Aglykons mit dem  $\epsilon$ -Pyrromycinon führte zum Schluß, daß die beiden Verbindungen identisch sind<sup>12)</sup>.

*Tetraacetyl-Derivat*: 200 mg Aglykon wurden mit 10 ccm Acetanhydrid und 10 ccm Pyridin 18 Stdn. stehengelassen. Der Rückstand, der nach dem Eindampfen i. Vak. zurückblieb, wurde in 10 ccm heißem Methanol gelöst, nach dem Erkalten von einer geringen Menge eines amorphen Niederschlags abfiltriert. Nach dem Anreiben mit Glasstab fiel das Tetraacetyl-Derivat in feinen hellgelben Stäbchen aus, welche nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol bei 203–210° unter Zersetzung schmolzen. Zur Analyse wurde zwei Tage i. Hochvak. bei 85° getrocknet.

$C_{30}H_{28}O_{13}$  (596.5) Ber. C 60.40 H 4.74 4  $CH_3CO$  28.80 Gef. C 60.39 H 4.95  $CH_3CO$  28.92

UV-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol,  $\lambda_{max}$  in  $m\mu$  (log  $\epsilon$ ): 215 (4.40), 261 (4.18), 285 (3.93), 347 (3.75).

Obwohl das Tetraacetyl-Derivat in Chloroform ( $c = 1$ ,  $l = 1$  dm) kein meßbares optisches Drehungsvermögen bei der  $Na_D$ -Linie aufweist, zeigt seine Rotationsdispersionskurve, die wegen der starken Absorption nur bis 400  $m\mu$  gemessen werden konnte<sup>21)</sup>, daß es optisch aktiv ist. Es besitzt in Chloroform ( $c = 0.06$ ) ein  $[\alpha]_{410} + 100 \pm 30^\circ$ .

*Identifizierung der flüchtigen Säuren nach der Kuhn-Roth-Oxydation des Aglykons*: 71 mg Aglykon wurden nach der von WIESENBERGER<sup>22)</sup> modifizierten Methode oxydiert und die flüchtigen Säuren mit Natronlauge neutralisiert. Die i. Vak. eingedampfte Lösung wurde in 1 ccm Wasser gelöst und papierchromatographisch untersucht. Proben 5  $\mu l$ , Papier: Schleicher & Schüll, Nr. 2043 b, säuregewaschen und maschinengeglättet. Lösungsmittelsystem: Alkohol/Ammoniak/Wasser (8:1:1), Indikator: Methylrot. Die flüchtigen Säuren bildeten nach der papierchromatographischen Untersuchung ein Gemisch, das ausschließlich aus Essigsäure und Propionsäure bestand, wobei die Propionsäure mengenmäßig deutlich überwog.

*Reduzierende Acetylierung*: 33 mg Tetraacetyl-aglykon, 500 mg trockener Zinkstaub und 500 mg frisch geschmolzenes Natriumacetat wurden mit 5 ccm Acetanhydrid 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Das Acetylierungsgemisch wurde mit Eiswasser zersetzt und nach 30 Min. mit Benzol ausgezogen. Der Rückstand nach dem Eindampfen des mit Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen Benzol-Auszuges wurde in Benzol-Lösung durch eine Säule aus 1 g Aluminiumoxyd (Akt. III) filtriert, wobei man 7 mg eines blaßgelben, blau fluoreszierenden Eluates erhielt. Dieses zeigte in 96-proz. Alkohol die für 2.3-Tetramethylen-9.10-diacetoxy-anthracen-Derivate typischen Absorptionsmaxima im UV bei 236, 264, 284, 344, 360, 380 und 400  $m\mu$ .<sup>3f)</sup>

*Bis-anhydro-aglykon ( $\eta$ -Pyrromycinon) (II)*: 15 mg Aglykon wurden bei 0.01 Torr und 170–180° sublimiert. Das Sublimat wurde einmal aus Benzol umkristallisiert und resublimiert, worauf es sich als papierchromatographisch einheitlich erwies. Es bildete feine Nadelchen vom Schmp. 239–242°.

$C_{22}H_{16}O_7$  (392.4) Ber. C 67.34 H 4.11 O 28.55  $OCH_3$  7.90 (C) $CH_3$  3.82 akt. H 0.77  
Gef. C 67.00 H 4.08 O 28.48  $OCH_3$  8.26 (C) $CH_3$  3.13 akt. H 0.81

<sup>21)</sup> Aufgenommen mit der Apparatur nach TH. BÜRER, M. KOHLER und Hs. H. GÜNT-HARD, *Helv. chim. Acta* 41, 2216 [1958]. Wir danken Hrn. Dr. TH. BÜRER für die Aufnahme.

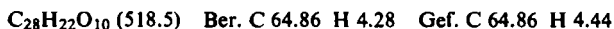
<sup>22)</sup> E. WIESENBERGER, *Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta* 33, 51 [1948].

Absorptionsspektrum im UV und im Sichtbaren aufgenommen in 96-proz. Äthanol bzw. in Acetanhydrid unter Zusatz von Pyroboracetat vgl. Tab. 2.

IR-Absorptionsspektrum in KBr: Banden bei 2.85, 3.33, 3.45, 5.81, 5.97, 6.06, 6.17 (S), 6.23, 6.27  $\mu$ .

In Göttingen wurde papierchromatographisch gezeigt, daß das Bis-anhydro-aglykon mit  $\eta$ -Pyrromycinon identisch ist<sup>12)</sup>.

*Triacetyl-Derivat*: 170 mg Bis-anhydro-aglykon wurden mit 15 ccm Acetanhydrid und 15 ccm Pyridin über Nacht stehengelassen. Das auf übliche Weise erhaltene rohe Acetylierungsprodukt ergab durch Umlösen aus Methanol ein nicht einheitliches Kristallisat. Es wurde deshalb einer 70stufigen Craig-Verteilung mit dem Lösungsmittelsystem 1.4 / Tetrachlorkohlenstoff, 0.6 / Petroläther, 1.7 / Methanol und 0.3 / Wasser unterworfen. Aus den Fraktionen 13–26 wurden 15 mg einer goldgelben Verbindung erhalten, die aus Methanol feine Nadelchen vom Schmp. 220–224° bildete und nicht weiter untersucht wurde. Die Fraktionen 30–47 lieferten nach Kristallisation aus Methanol 77 mg hellgelbe Stäbchen, die sich bei 185–190° in feinere Nadelchen umwandelten, um bei 208–211° endgültig zu schmelzen. Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei 85° getrocknet.



Wie die folgende Zusammenstellung der Maxima zeigt, ist das Absorptionsspektrum im UV demjenigen des Tetracenchinons sehr ähnlich.

Triacetyl-Derivat in 96-proz. Äthanol,  $\lambda_{\text{max}}$  in  $m\mu$  (log  $\epsilon$ ): 250 (4.66), 288 (4.36), 301 (4.39), 320 (4.06), 392 (3.82). Tetracenchinon in  $\text{CHCl}_3$ : 248 (4.53), 288 (4.49), 297 (4.52), 320 (3.88), 395 (3.71)<sup>23)</sup>.

Das IR-Absorptionsspektrum in KBr zeigt im  $6\mu$ -Gebiet Banden bei 5.64, 5.80, 5.96, 5.97 (S), 6.19, 6.29  $\mu$ .

Das gleiche Triacetyl-Derivat entsteht aus dem Aglykon durch Acetylierung in der Wärme. 50 mg Aglykon und 60 mg wasserfreies Natriumacetat wurden 1 Stde. mit 2 ccm Acetanhydrid unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach dem Erkalten 30 Min. mit Wasser stehengelassen und darauf mit Benzol ausgeschüttelt. Die mit Wasser gründlich gewaschenen Benzol-Auszüge hinterließen beim Eindampfen 57 mg Rückstand, aus welchem nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol gelbe Kristalle erhalten wurden, die in jeder Hinsicht mit dem Triacetyl-Derivat des Bis-anhydro-aglykons identisch waren.

*Reduzierende Acetylierung*: 100 mg Triacetyl-bis-anhydro-aglykon, 1 g trockener Zinkstaub und 1 g frisch geschmolzenes Natriumacetat wurden mit 10 ccm Acetanhydrid 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Die übliche Aufarbeitung des Acetylierungsgemisches ergab 103 mg eines amorphen Rückstandes, der an 2 g Aluminiumoxyd (Akt. III) chromatographiert wurde. 20 ccm Benzol eluierten 50 mg einer tief orangegelben, grünlich fluoreszierenden Verbindung, deren UV-Absorptionsspektrum in 96-proz. Äthanol die für 9.10-Diacetoxy-tetracene typischen Absorptionsmaxima bei 235, 273, 284, 380, 403, 430, 458 und 490  $m\mu$  zeigte<sup>3f)</sup>.

*Alkalische Verseifung des Aglykons*: 1.18 g Aglykon wurden mit 300 ccm 2*n* NaOH 90 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Durch Ansäuern der mit Eis gekühlten tiefblauen Lösung mit konz. Salzsäure fielen rot gefärbte Flocken aus, die dreimal mit je 300 ccm Äthylacetat ausgezogen wurden. Aus den neutralen Anteilen, die bei der Extraktion der Äthylacetat-Auszüge mit Natriumcarbonat-Lösung in Äthylacetat zurückblieben, ließen sich durch Eindampfen und Kristallisation aus Benzol 50 mg reines Bis-anhydro-aglykon erhalten. Durch Ansäuern der Natriumcarbonat-Auszüge und Ausziehen mit Äthylacetat wurden 930 mg saure Anteile

23) Das UV-Absorptionsspektrum des Tetracenchinons verdanken wir Hrn. Dr. B. MANUKIAN.

gewonnen. Diese ließen sich durch Verestern mit Methanol in das Bis-anhydro-aglykon überführen. 200 mg der sauren Anteile wurden mit 50 ccm absol. Methanol und 1 ccm konz. Schwefelsäure 48 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde dann i. Vak. eingeeengt und mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Durch Ausziehen mit Natriumcarbonat konnten aus den Äthylacetat-Auszügen 100 mg der unveränderten Säure zurückgewonnen werden. Die im Äthylacetat verbliebenen neutralen Anteile wogen nach Eindampfen i. Vak. 110 mg. Durch Sublimation i. Hochvak. wurde daraus das *Bis-anhydro-aglykon* in Form roter Nadelchen vom Schmp. 237–238.5° erhalten.

*Des-carbomethoxy-bis-anhydro-aglykon (III)*: 558 mg saure Anteile, welche bei der alkalischen Hydrolyse des Aglykons erhalten wurden, erhitze man in 6 ccm Chinolin mit 1 g Kupferpulver 90 Min. auf 240–260°. Nach dem Erkalten wurde in Äthylacetat aufgenommen, mit verd. Salzsäure, Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Aus dem Rückstand erhielt man durch Umlösen aus Benzol/Methanol 177 mg eines Kristallisates, das zur Analyse i. Hochvak. bei 170° sublimiert wurde: feine orangebraune Stäbchen vom Schmp. 233–235°.

$C_{20}H_{14}O_5$  (334.4) Ber. C 71.85 H 4.22 (C)CH<sub>3</sub> 4.47 Gef. C 71.87 H 4.56 (C)CH<sub>3</sub> 3.16

Das in 96-proz. Äthanol aufgenommene Absorptionsspektrum im UV und im Sichtbaren zeigte folgende  $\lambda_{\max}$  in m $\mu$  (log  $\epsilon$ ): 253 (4.50), 275 (4.47), 307 (3.99), 458 (3.84), 490 (4.12), 496 (4.11), 513 (4.17), 524 (4.25), 553 (3.96), 565 (4.09).

Im IR-Absorptionsspektrum in KBr findet man im 6 $\mu$ -Gebiet nur noch folgende Banden: 6.06, 6.20 und 6.27 $\mu$ .

*Triacetyl-Derivat*: Die auf übliche Weise mit Acetanhydrid/Pyridin bei Raumtemperatur hergestellte Verbindung schmolz nach Umkristallisieren aus Benzol/Methanol bei 218°.

$C_{26}H_{26}O_8$  (460.4) Ber. C 67.82 H 4.38 Gef. C 68.15 H 4.61

Das UV-Absorptionsspektrum, welches in 96-proz. Äthanol aufgenommen wurde, ist ähnlich demjenigen des Tetracenchinons (vgl. Triacetyl-bis-anhydro-aglykon) und besitzt folgende  $\lambda_{\max}$  in m $\mu$  (log  $\epsilon$ ): 252 (4.67), 294 (4.28), 305 (4.33), 325 (3.94) und 400 (3.74).

Die Mikroanalysen wurden im Mikrolaboratorium der Eidg. Techn. Hochschule (Leitung W. MANSER) ausgeführt.