

HANS BROCKMANN und WERNER LENK

Über Actinomycetenfarbstoffe, VII¹⁾

Pyrromycin²⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen
(Eingegangen am 20. März 1959)

Aus einem *Streptomyces*-Stamm wurde ein roter, antibiotisch wirksamer, basischer Farbstoff, das *Pyrromycin*, als krist. Hydrochlorid $C_{30}H_{35}NO_{11} \cdot HCl$ isoliert. Pyrromycin ist ein Glykosid aus 1 Mol. ϵ -Pyrromycinon und 1 Mol. Rhodosamin, einem Dimethylamino-Zucker, der zuerst als Abbauprodukt von Rhodomycin A und B aufgefunden wurde. Rhodosamin ist über seine C-1-Hydroxygruppe glykosidisch mit der sekundären Hydroxygruppe in Ring A des ϵ -Pyrromycinons verbunden.

Wie in der VI. Mitteilung¹⁾ erwähnt, erhielten wir aus Mycel und Kulturlösung eines *Streptomyces*-Stammes³⁾ neben einem Gemisch von Pyrromycinonen eine „Fraktion X“. Ihre Aufarbeitung nach folgendem Schema lieferte eine in feuerroten Nadeln kristallisierende Verbindung, die im Gegensatz zu den Pyrromycinonen wasserlöslich ist und Stickstoff sowie Chlor enthält. Sie ist das Hydrochlorid eines basischen Farbstoffes, den wir *Pyrromycin* genannt haben. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei p_H 8.7 (ermittelt aus der Wanderungsgeschwindigkeit des Farbstoff-Kations bei verschiedenem p_H). Da zur Extraktion des Mycels salzsäurehaltiges Aceton verwendet wurde, ist verständlich, daß der Farbstoff als Hydrochlorid anfiel.

Isolierung von Pyrromycin-hydrochlorid

Fraktion X erschöpfend mit Chloroform extrahiert:

Rückstand	<i>Lösung</i>
Enthält Verunreinigungen	I. Vak. verdampft, Rückstand mit Wasser extrahiert
Rückstand	<i>Lösung</i>
Pyrromycinone	I. Vak. verdampft, Rückstand mit Aceton extrahiert. Aus Acetonextrakt krist. <i>Pyrromycin-hydrochlorid</i>

Pyrromycin-hydrochlorid schmilzt bei 162–163° (Zers., KOFLER-Block, korrig.) und ist optisch aktiv ($[\alpha]_{CD}^{20}$: $+132 \pm 27^\circ$; $c = 0.4$, in Methanol). Es löst sich leicht in Wasser, Methanol und Pyridin, mäßig in Chloroform und schwer in Benzol; die braunroten Lösungen fluoreszieren intensiv grün. Von wäbr. Alkali wird es mit violetter Farbe aufgenommen. In konz. Schwefelsäure schlägt die zunächst violette Lösungsfarbe in kürzester Zeit nach Blau um.

Pyrromycin-hydrochlorid ist antibiotisch mäßig wirksam, es hemmte das Wachstum eines *St. aureus*-Stammes bis zur Verdünnung $1:2 \times 10^5$ und das eines *B. subtilis*-Stammes bis $1:4 \times 10^5$. Ebenso wie die Hydrochloride der basischen Rhodomycine

¹⁾ VI. Mitteil.: H. BROCKMANN und W. LENK, Chem. Ber. 92, 1880 [1959], vorstehend.

²⁾ Vorgetragen auf dem *Corso Estivo di Chimica in Varenna* am 6. X. 1958.

³⁾ W. FROMMER, unveröffentlicht.

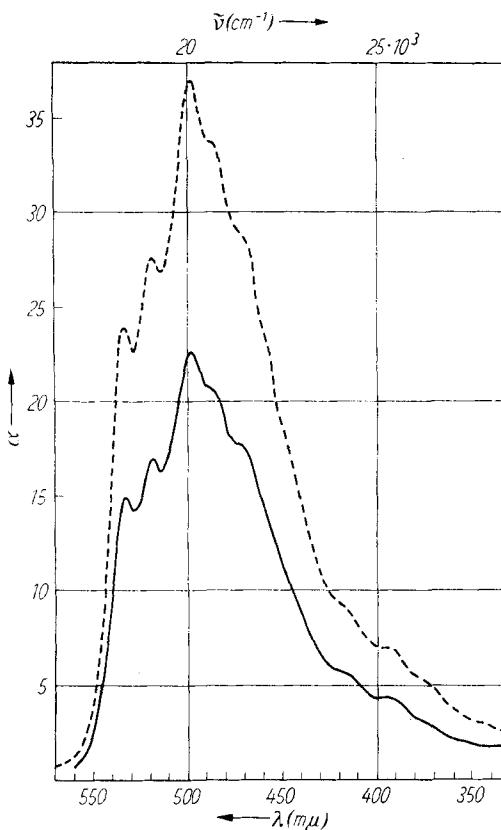
und Iso-rhodomycine⁴⁾ hält Pyrromycin-hydrochlorid hartnäckig Lösungsmittel fest, verliert, wenn es bei höherer Temperatur getrocknet wird, Chlorwasserstoff und nimmt an der Luft schnell wieder eine begrenzte Menge Wasser auf. Daher waren die Analysenzahlen nicht mit der üblichen Genauigkeit zu reproduzieren und erlaubten nur die Aufstellung einer Näherungsformel $C_{28-29}H_{35-37}NO_{11} \cdot HCl$. Die richtige Bruttoformel $C_{30}H_{35}NO_{11} \cdot HCl$ ergab sich aus dem unten beschriebenen Abbauversuch.

Mit Acetanhydrid-Tosylchlorid-Pyridin wurde Pyrromycin-hydrochlorid zu einem kristallisierten, gelben Hydrochlorid verestert. Seine Analysenzahlen paßten leidlich auf

$C_{30}H_{31}NO_{11}(CH_3 \cdot CO)_4 \cdot HCl$, d. h. auf ein Tetraacetat, dem die durch Abbau ermittelte Pyrromycin-hydrochlorid-Formel $C_{30}H_{35}NO_{11} \cdot HCl$ zugrunde liegt.

In der Gestalt seiner Absorptionskurve und der Lage seiner Maxima (Abbild.) stimmt Pyrromycin-hydrochlorid mit ϵ -Pyrromycinon überein, für das die Konstitutionsformel I abgeleitet wurde¹⁾. In methanol. 0.05 n HCl, in der keine Zwitterionen vorliegen, sind die Extinktionswerte des Pyrromycin-hydrochlorids im Mittel um 68.4% niedriger als die des ϵ -Pyrromycinons. Daraus ließ sich schließen: Pyrromycin ist eine Verbindung des ϵ -Pyrromycinons mit einer farblosen Komponente, deren Anteil 31.6% des Pyrromycin-hydrochlorides beträgt.

Einblick in die Konstitution des Pyrromycins brachte der Abbau mit 0.1 n HCl (2–3 Stdn. bei 65–70°). Dabei fiel in einer Ausbeute von 65% des Ausgangsmaterials ein rotes Produkt aus, das sich durch Chromatographie aus Benzol an Kieselgel in eine Hauptfraktion (etwa 90% des Niederschlages) und eine schneller wandernde Nebenfraktion zerlegen ließ.



Absorptionsspektren in Chloroform
 ϵ -Pyrromycinon — — ;

Lage der Maxima in $m\mu$: 533, 518, 498;
 Pyrromycin-hydrochlorid — — ;

Lage der Maxima in $m\mu$: 533, 518, 498.

Extinktionswerte infolge Zwitterionen-Bildung
 etwas niedriger als in methanol. 0.05 n HCl (s. unten)

⁴⁾ H. BROCKMANN und P. PATT, Chem. Ber. 88, 1455 [1955].

Die Hauptfraktion, dünne feuerrote Nadeln vom Schmp. 213–214°, wurde durch Analysenzahlen, Misch-Schmp. und R_F -Wert (Ring-Papierchromatogramm, Decalin-Tetralin (1:2)/Eisessig-Wasser (10:1)) als ϵ -Pyrromycinon (I) identifiziert.

Die Nebenfraktion, dunkelrote Kristalle vom Schmp. 237–238° (KOFLER-Block, korrig.) gab sich durch Analysenzahlen und Misch-Schmp. als γ -Pyrromycinon zu erkennen, für das die Konstitutionsformel II abgeleitet wurde¹⁾. Zweifellos ist es ein Sekundärprodukt, denn ϵ -Pyrromycinon verwandelt sich unter Säureeinwirkung leicht in γ -Pyrromycinon¹⁾.

Als zweites Abbauprodukt isolierten wir aus dem Säurehydrolysat des Pyrromycin-hydrochlorids ein farbloses Hydrochlorid $C_8H_{17}NO_3 \cdot HCl$ vom Schmp. 152–153° (KOFLER-Block, korrig.) ($[\alpha]_D^{20} = -45.8 \pm 2.8^\circ$; $c = 1.0$, in Wasser), das eine positive Ninhydrin- und Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Reaktion gab. Es wurde durch Analyse, Misch-Schmp., spezif. Drehung, IR-Spektrum und R_F -Werte (Ring-Papierchromatogramm, n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und n-Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:5)) als Rhodosamin-hydrochlorid identifiziert. Rhodosamin ist ein Dimethylamino-Zucker, der vor einiger Zeit als Abbauprodukt der Rhodomycine A und B aufgefunden wurde⁵⁾. Für Rhodosamin, das isomer ist mit Pikrocin⁶⁾ (Desosamin⁷⁾) stehen die Formeln III a und III b zur Diskussion, von denen III a als die wahrscheinlichere gelten kann.

Nimmt man an, daß im Pyrromycin ein Mol. Rhodosamin glykosidisch mit einem Mol. ϵ -Pyrromycinon (I)⁸⁾ verknüpft ist, so kommt man für Pyrromycin-hydrochlorid zur oben angeführten Formel $C_{30}H_{35}NO_{11} \cdot HCl$. Unsere Analysenzahlen passen auf sie zwar weniger gut als auf eine um CH_2 kleinere Formel, doch schließen sie aus, daß neben Rhodosamin noch andere Gruppen im Pyrromycin vorhanden sind. Zum gleichen Ergebnis führen: a) die oben erwähnten Extinktionsmessungen, nach denen Pyrromycin-hydrochlorid 68.4% ϵ -Pyrromycinon enthält, während der nach der C_{30} -Formel berechnete Gehalt 68.8% ist, und b) die Pyrromycinonausbeute bei der Säurehydrolyse des Pyrromycin-hydrochlorids, die auf ϵ -Pyrromycinon berechnet⁹⁾ 0.95 Moll. beträgt.

Rhodosamin reduziert Triphenyl-tetrazoliumchlorid und Fehlingsche Lösung, Pyrromycin dagegen nicht. Daraus kann man schließen, daß Rhodosamin im Pyrromycin über seine C-1-Hydroxygruppe glykosidisch mit einer Hydroxygruppe des ϵ -Pyrromycinons verbunden ist. Da Pyrromycin-hydrochlorid im Absorptionsspektrum bis auf die Extinktion mit Pyrromycin übereinstimmt, müssen die drei α -Hydroxygruppen des ϵ -Pyrromycinons im Pyrromycin frei sein; d. h. das Rhodosamin

⁵⁾ H. BROCKMANN und E. SPOHLER, Naturwissenschaften **42**, 154 [1955]; ausführlichere Mitteil. demnächst in dieser Zeitschr.

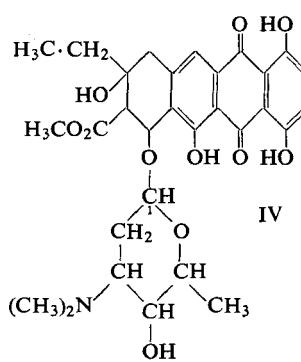
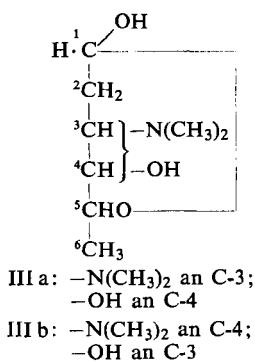
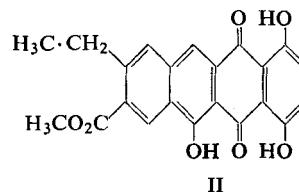
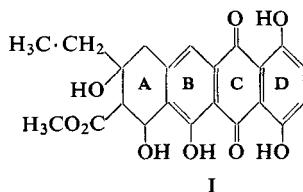
⁶⁾ H. BROCKMANN, H. B. KÖNIG und R. OSTER, Chem. Ber. **87**, 856 [1954].

⁷⁾ R. K. CLARK JR., Antibiotics and Chemotherapy **3**, 663 [1953]; E. H. FLYNN, M. V. SIGAL, P. F. WILEY und K. GERZON, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3121 [1954].

⁸⁾ In dieser Formel ist die Stellung der beiden Hydroxygruppen in Ring A nicht exakt bewiesen. Als gesichert kann gelten, daß die eine sekundär, die andere tertiär ist und beide nicht benachbart sind. Außerdem könnten Äthyl- und Carbomethoxygruppe vertauscht sein. Für Formel I spricht, daß sie allein mit der Acetathypothese in Einklang steht.

⁹⁾ d. h., obgleich das ausgefallene ϵ -Pyrromycinon etwa 10% γ -Pyrromycinon enthält, ist es als reines ϵ -Pyrromycinon in Rechnung gesetzt.

ist mit einer Hydroxygruppe in Ring A des ϵ -Pyrromycinons veräthert. Wäre es die nicht acetylierbare tertiäre Hydroxygruppe, so müßte Pyrromycin ein Pentaacetat bilden. Bei der Veresterung mit Acetanhydrid-Tosylchlorid-Pyridin entsteht jedoch,



wie gezeigt, nur ein Tetraacetat. Danach ist anzunehmen, daß die sekundäre Hydroxygruppe in Ring A Träger des Rhodosamin-Restes ist. Für Pyrromycin ergibt sich dann — vorausgesetzt, daß Rhodosamin die Konstitution III a hat — die Formel IV. Da in ihr eine Dimethylaminogruppe drei schwach sauren α -Hydroxygruppen gegenübersteht, ist verständlich, daß der isoelektrische Punkt des Pyrromycins bei 8.7 liegt.

Pyrromycin steht den von V. PRELOG und Mitarb.¹⁰⁾ untersuchten Cinerubinen A und B nahe, die isomere basische Verbindungen der Formel $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{NO}_{18} \pm \text{CH}_2$ sind und durch Säure zu ϵ -Pyrromycinon sowie einem aus drei Komponenten bestehenden Zuckergemisch abgebaut werden. Eine der Komponenten ist ein Dimethylamino-Zucker vom Typ des Pikrocins oder Rhodosamins.

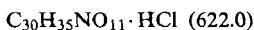
Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, dem FONDS DER CHEMIE und den FÄRBEFABRIKEN BAYER, Werk Elberfeld, danken wir für Unterstützung unserer Arbeiten.

¹⁰⁾ L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER und H. ZÄHNER, Chem. Ber. 92, 1867 [1959].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Pyrromycin-hydrochlorid: 65 g „Fraktion X“¹¹⁾ extrahierte man im Soxhlet-Apparat erschöpfend mit insgesamt 2.5 l Chloroform, verdampfte den dunkelbraunen Chloroformauszug und digerierte den zähflüssigen Rückstand mit Wasser, wobei das Pyrromycin in Lösung ging und wasserunlösliche Pyrromycinone zurückblieben.

Den Wasserauszug verdampfte man bei 45° i. Vak., nahm den Rückstand in wenig Methanol auf, versetzte mit dem gleichen Vol. Aceton, filtrierte, verdampfte i. Vak. zur Trockne und kochte den schmierigen, braunroten Rückstand wiederholt mit Aceton aus. Aus dem Acetonextrakt fiel Pyrromycin-hydrochlorid in feuerroten, feinen Kristallen aus (bei langsamem Auskristallisieren dunkelrote Kristalle). Schmp. 162–165°.



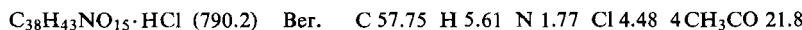
Ber. C 57.92 H 5.83 N 2.25 Cl 5.70 1CH₃O 4.98 2C-CH₃ 4.8 N-CH₃ 2.4

Gef. *) C 56.68 H 6.42 N 2.54 Cl 7.20 CH₃O 4.36 C-CH₃ 5.0 N-CH₃ 2.8

*) 5 Stdn. über P₂O₅ i. Vak. getrocknet.

Pyrromycin-tetraacetat-hydrochlorid: Eine Mischung von 300 mg Pyrromycin-hydrochlorid, 10 ccm Acetanhydrid, 1 ccm Pyridin und 100 mg Tosylchlorid wurde 3 Stdn. bei Raumtemperatur gehalten und dann in Wasser gegossen. Nach Verseifung des Acetanhydrids schüttelte man mit Chloroform aus, nahm den Verdampfungsrückstand des Chloroformauszuges in Aceton auf und gab die Lösung auf eine Säule von aktiviertem Kieselgel¹²⁾. Beim Nachwaschen mit Aceton bildeten sich mehrere Zonen, von denen die Hauptzone das Tetraacetat enthielt. Ihr Eluat verdampfte man i. Vak., löste den Rückstand in wenig Aceton und versetzte bis zur Trübung mit Cyclohexan.

Das Tetraacetat fiel in feinen, hellgelben Kristallen aus, die sich ab 157° ohne scharfen Schmelzpunkt zersetzen. ([α]_D²⁵: +52 ± 2.5°; c = 1.0, in Chloroform). Leicht löslich in Wasser, Methanol und Chloroform, schwer löslich in Benzol und Cyclohexan.



Ber. C 57.75 H 5.61 N 1.77 Cl 4.48 4CH₃CO 21.8

Gef. *) C 58.17 H 6.00 N 1.70 Cl 3.4 CH₃CO 22.4

*) 3 Stdn. i. Vak. bei 80° über P₂O₅ getrocknet.

Säurehydrolyse von Pyrromycin-hydrochlorid: Eine Lösung von 25.4 mg Pyrromycin-hydrochlorid in 100 ccm 0.1 n HCl hielt man 2^{1/2} Stdn. auf 65–70°, sammelte den ausgefallenen Niederschlag auf einer gewogenen Nutsche und trocknete bis zur Gewichtskonstanz i. Vak. über P₂O₅. Ausb. 16.7 mg = 0.95 Moll. ϵ -Pyrromycinon.

a) *Isolierung von ϵ -Pyrromycinon und η -Pyrromycinon*: Eine Lösung von 1 g Pyrromycin-hydrochlorid in 200 ccm 0.1 n HCl erwärmte man 2^{1/2} Stdn. auf 65–70° und filtrierte den roten Niederschlag ab (640 mg). Seine Lösung in Benzol (2% Aceton enthaltend) chromatographierte man unter Nachwaschen mit Benzol an einer Kieselgel-Säule, wobei sich eine breite, rote Hauptzone und eine schneller wandernde Nebenzone bildeten.

Das Eluat der Nebenzone hinterließ einen Verdampfungsrückstand, der aus heißem Benzol in roten, dünnen Nadeln vom Schmp. 237–238° (KOFLER-Block, korr.) kristallisierte. Mit η -Pyrromycinon keine Schmp.-Erniedrigung.



Ber. C 67.34 H 4.11 1CH₃O 7.9 Gef. *) C 67.40 H 4.11 CH₃O 7.9

*) 8 Stdn. i. Hochvak. bei 85° getrocknet.

¹¹⁾ Vgl. Schema S. 1904.

¹²⁾ Kieselgel (GEBR. HERRMANN, Köln-Ehrenfeld, Korngröße 0.1–0.075 mm) mit 20-proz. Salzsäure digeriert, mit Wasser neutral gewaschen, mit 0.1 n HCl aufgeschlämmt und bei 120° getrocknet.

Der Inhaltsstoff der Hauptzone kristallisierte aus Benzol in feuerroten Nadeln vom Schmp. 213–214° (KOFLER-Block, korrig., Sintern bei 182–183°). Im Gemisch mit ϵ -Pyrromycinon keine Schmp.-Erniedrigung.

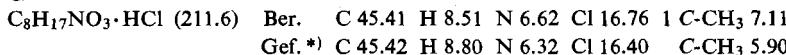


*) 8 Stdn. i. Hochvak. bei 80° getrocknet.

b) *Isolierung des wasserlöslichen Abbauproduktes (Rhodosamin):* Das vom Pyrromycinon-Niederschlag abfiltrierte Hydrolysat gab man nach Entfärbung mit wenig Aktivkohle auf eine Säule aus Kationen-Austauscher Dowex 50 W \times 8 (mit 4n HCl in die H-Form gebracht und mit dest. Wasser neutral gewaschen) und entwickelte mit 2n HCl. Im UV-Licht war das Rhodosamin auf dem hellblau fluoreszierenden Austauscher als dunkle Zone zu erkennen, die rasch durch die Säule wanderte. Das Filtrat wurde in 2.5-ccm-Anteilen aufgefangen und auf optische Aktivität geprüft.

Die vereinigten optisch aktiven Fraktionen brachte man durch Zugabe des Anionen-Austauschers Amberlite IR 4 B (mit wässr. 4-proz. NaOH vorbehandelt und neutral gewaschen) auf p_{H} 6.5 und verdampfte die mit wenig Aktivkohle entfärbte Lösung i. Vak. bei 50°.

Nachdem der farblose, zähflüssige Rückstand mehrmals aus wenig Methanol mit Aceton umgefällt worden war, nahm man ihn in wenig absol. Methanol auf, versetzte mit Aceton bis zur Trübung und hielt längere Zeit bei niedriger Temperatur. Dabei schieden sich nach einiger Zeit farblose Würfel vom Schmp. 152–153° (KOFLER-Block, korrig.) ab, die im Gemisch mit Rhodosamin-hydrochlorid⁵⁾ keine Schmp.-Erniedrigung zeigten. $[\alpha]_D^{20} = -45.8 \pm 2.8^\circ$; $c = 1.0$, in Wasser). Im Ring-Papierchromatogramm (n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und n-Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:5)) zeigten beide Präparate den gleichen R_F -Wert (Zonen sichtbar gemacht mit: a) Triphenyl-tetrazoliumchlorid, b) Ninhydrin oder c) äthanol. Jodlösung).



*) 8 Stdn. i. Hochvak. bei 80° getrocknet.