

HANS BROCKMANN und JOST HENRICH MANEGOLD

Actinomycine, XXIII; Antibiotica aus Actinomyceten, XLV<sup>1)</sup>

## Überführung von Actinomycin X<sub>2</sub> in die Actinomycine C<sub>1</sub>, X<sub>0β</sub> und X<sub>0δ</sub>

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 3. Oktober 1960)

*Richard Kuhn zum 60. Geburtstag gewidmet*

Actinomycin X<sub>2</sub> enthält ein Molekül L-γ-Oxo-prolin, das damit zum ersten Mal als Bestandteil eines Naturstoffes nachgewiesen ist. Katalytische Hydrierung in Eisessig reduziert das L-γ-Oxo-prolin des Actinomycins X<sub>2</sub> teils zu L-Prolin, teils zu L-*allo*-Hydroxy-prolin. Im ersten Fall entsteht aus Actinomycin X<sub>2</sub> das in seiner Konstitution bekannte Actinomycin C<sub>1</sub>, im zweiten das bisher unbekannte Actinomycin X<sub>0δ</sub>. — Aluminiumisopropylat reduziert Actinomycin X<sub>2</sub> — unter Umwandlung seines L-γ-Oxo-prolins in L-Hydroxy-prolin — zu Actinomycin X<sub>0β</sub>. — Durch diese Reaktionen wird die Konstitution der Actinomycine X<sub>2</sub>, X<sub>0β</sub> und X<sub>0δ</sub> soweit aufgeklärt, daß für jedes nur noch zwei Formeln zur Diskussion stehen.

Zur Actinomycin-Synthese befähigte *Streptomyces*-Stämme bilden stets mehrere Actinomycine nebeneinander und können der Zusammensetzung dieser Actinomycingemische entsprechend in verschiedene Gruppen eingeteilt werden <sup>2,3)</sup>. Eine von ihnen ist dadurch charakterisiert, daß ihr Actinomycingemisch als Hauptkomponente das Actinomycin X<sub>2</sub><sup>4)</sup> enthält.

Dieses Gemisch hat man anfangs für eine einheitliche Substanz gehalten und als „Actinomycin X“<sup>4)</sup> bezeichnet. Später, als seine Auftrennung gelang, wurden die chromatographisch einheitlichen, kristallisierten Komponenten des Gemisches der Reihenfolge ihrer R<sub>F</sub>-Werte gemäß Actinomycin X<sub>0δ</sub><sup>5,6)</sup>, X<sub>0γ</sub><sup>7)</sup>, X<sub>1</sub><sup>4)</sup>, X<sub>1a</sub><sup>7)</sup>, X<sub>2</sub><sup>4)</sup> und X<sub>3</sub><sup>8)</sup> genannt. Der Name „Actinomycin X“ ist damit überholt und den Buchstaben X allein sollte man in Zukunft auf diesem Gebiet nur noch in Bezeichnungen wie „Actinomycingemisch X“ oder „Actinomycinkomplex X“ zur Charakterisierung von „nativen“<sup>9)</sup> Actinomycingemischen verwenden, deren Hauptkomponente Actinomycin X<sub>2</sub> ist.

<sup>1)</sup> XXII. bzw. XLIV. Mitteil.: H. BROCKMANN, G. PAMPUS und R. MECKE, Chem. Ber. **92**, 3082 [1959].

<sup>2)</sup> H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Naturwissenschaften **41**, 65 [1954].

<sup>3)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN und H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. **26**, 192 [1957].

<sup>4)</sup> H. BROCKMANN, H. LINGE und H. GRÖNE, Naturwissenschaften **40**, 224 [1953].

<sup>5)</sup> H. BROCKMANN und G. PAMPUS, Angew. Chem. **67**, 519 [1955].

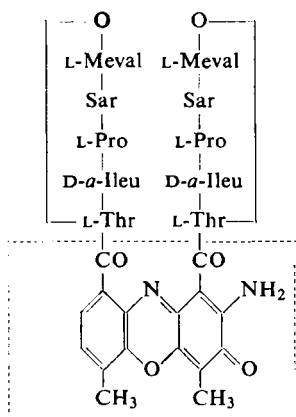
<sup>6)</sup> H. BROCKMANN, G. PAMPUS und J. H. MANEGOLD, Chem. Ber. **92**, 1294 [1959].

<sup>7)</sup> H. BROCKMANN und J. H. MANEGOLD, Naturwissenschaften **47**, im Druck [1960].

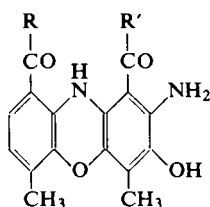
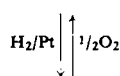
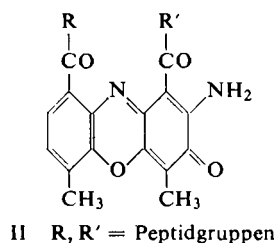
<sup>8)</sup> W. FROMMER, Arch. Mikrobiol. **34**, 1 [1959].

<sup>9)</sup> „Native“ Actinomycingemische sind solche, die unter den üblichen Kulturbedingungen von Mikroorganismen produziert werden.

Im folgenden berichten wir über Versuche zur Konstitutionsermittlung der Actinomycine  $X_2$  und  $X_{08}$  sowie des bisher unbekannten Actinomycins  $X_{08}$  und beginnen dabei mit dem Actinomycin  $X_2$ <sup>10)</sup>.



I D-a-Ileu = D-allo-Isoleucin



Wie schon vor einiger Zeit nachgewiesen<sup>11)</sup>, hat der für die gelbrote Farbe des Actinomycins  $X_2$  verantwortliche Teil seines Moleküls die gleiche Konstitution wie der „Chromophor“ der Actinomycine  $C_1$ <sup>2)</sup>,  $C_2$ <sup>2)</sup> und  $C_3$ <sup>2)</sup> (I), der als 3-Amino-1,8-dimethylphenoxazon-(2)-dicarbonsäure (*Actinocin*) identifiziert wurde<sup>12)</sup> (in I eingerahmt).

Aminosäureanalysen unseres Arbeitskreises<sup>13-15)</sup> haben gezeigt, daß Actinomycin  $X_2$  ebenso wie Actinomycin  $C_1$  je zwei Moleküle Threonin, Valin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin, im Gegensatz zum Actinomycin  $C_1$  jedoch nur ein Molekül Prolin enthält. Während es danach so aussah, als sei Actinomycin  $X_2$  um einen Peptid-Baustein ärmer als die Actinomycine  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_3$ , die alle insgesamt zehn Amino- bzw. *N*-Methylaminosäuren aufweisen, sprachen die Ergebnisse der Mol.-Gew.-Bestimmungen dagegen. Denn unter der Annahme, daß die Amino- bzw. *N*-Methylaminosäuren des Actinomycins  $X_2$  untereinander und mit dem Chromophor analog verknüpft sind wie im Actinomycin  $C_3$ , für das die Konstitution I bewiesen ist<sup>16,17,18)</sup>,

<sup>10)</sup> Ein Teil unserer Befunde wurde in einer vorläufigen Mitteil. veröffentlicht. H. BROCKMANN und J. H. MANEGOLD, *Naturwissenschaften* **45**, 310 [1958].

<sup>11)</sup> H. BROCKMANN und K. VOHWINKEL, *Naturwissenschaften* **41**, 257 [1954]; *Chem. Ber.* **89**, 1373 [1956].

<sup>12)</sup> H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, *Chem. Ber.* **91**, 1242 [1958].

<sup>13)</sup> H. BROCKMANN, G. BOHNSACK und H. GRÖNE, *Naturwissenschaften* **40**, 223 [1953].

<sup>14)</sup> H. VORBRÜGGEN, Diplomarbeit Univ. Göttingen 1955.

<sup>15)</sup> J. H. MANEGOLD, Dissertation Univ. Göttingen 1959.

<sup>16)</sup> H. BROCKMANN, G. BOHNSACK, B. FRANCK, H. GRÖNE, H. MUXFELDT und C. H. SÜLING, *Angew. Chem.* **68**, 70 [1956].

<sup>17)</sup> H. BROCKMANN und P. BOLDT, *Naturwissenschaften* **46**, 262 [1959].

<sup>18)</sup> H. BROCKMANN und P. BOLDT, *Naturwissenschaften* **47**, im Druck [1960].

war das für Actinomycin  $X_2$  berechnete Mol.-Gew. 1140. Gefunden dagegen wurde durch Redox-Titration<sup>19)</sup>  $1307 \pm 35$  und durch Vergleich der spezif. Extinktion von Actinomycin  $C_3$  und Actinomycin  $X_2$   $1283 \pm 20$ ; Werte also, die außerhalb der Fehlergrenze höher lagen als der berechnete und damit auf das Vorhandensein eines Bausteines schließen ließen, der bis dahin noch nicht als Abbauprodukt gefaßt war.

Aufklärung über die Natur dieses Bausteins gab die katalytische Hydrierung des Actinomycins  $X_2$ , die anders verlief als bei den Actinomycinen  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_3$ . Denn während diese schnell und quantitativ ein Mol. Wasserstoff aufnehmen und dabei in eine an der Luft leicht wieder zum Actinomycin (II) oxydierbare Dihydro-Verbindung (III) übergehen, verbrauchte Actinomycin  $X_2$  in Eisessig mit Platinkatalysator insgesamt etwa 3 Moll. Wasserstoff und lieferte ein Reduktionsprodukt, aus dem wir nach Rückoxydation an der Luft (Reaktion III  $\rightarrow$  II) chromatographisch zwei vom Ausgangsmaterial verschiedene, kristallisierte Actinomycine abtrennen konnten. Das eine, bei der Chromatographie (Aluminiumoxyd (II)/Äthylacetat) schneller wandernde, wurde durch  $R_F$ -Werte (Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat oder Butylacetat/Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat), Schmp., spezif. Drehung, C-, H-, N-Gehalt, Aminosäure-Gehalt und antibiotisch wirksame Grenzkonzentration (*B. subtilis*) als Actinomycin  $C_1$ <sup>2)</sup> identifiziert.

Das andere bei der Hydrierung aus Actinomycin  $X_2$  entstandene Actinomycin vom Schmp.  $245-246^\circ$  und  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-297 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , Methanol) war mit keinem bekannten Actinomycin identisch. Da sein  $R_F$ -Wert im System Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat etwas größer ist als der von Actinomycin  $X_{07}$  und mit dem der  $X_{08}$ -Fraktion von Actinomycingemischen X übereinstimmt, haben wir das neue Actinomycin durch das Symbol  $X_{08}$  gekennzeichnet. Gegen unseren *B. subtilis* Stamm war es bis zur Verdünnung  $1:4 \times 10^6$  wachstumshemmend, während beim gleichen Stamm für Actinomycin  $C_3$  Hemmwirkung bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$  gefunden wurde.

Im Papierchromatogramm (Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:7)) des Actinomycin  $X_{08}$ -Totalhydrolysates fanden wir außer den Aminosäuren des Actinomycins  $X_2$  ein Abbauprodukt, das durch  $R_F$ -Wert, Farbreaktion mit Isatin/*p*-Dimethylamino-benzaldehyd<sup>20)</sup> sowie  $R_F$ -Wert des Hochspannungs-Pherogramms<sup>21)</sup> als *allo*-Form des Hydroxy-prolins (V) identifiziert wurde. Wie die quantitative Aminosäure-Bestimmung zeigte<sup>15)</sup>, enthält Actinomycin  $X_{08}$  je 2 Moll. Threonin, Valin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin sowie je 1 Mol. Prolin (VI) und *allo*-Hydroxy-prolin.

Die katalytische Hydrierung des Actinomycins  $X_2$  (1 Mol. Prolin) zu Actinomycin  $C_1$  (2 Moll. Prolin) und Actinomycin  $X_{08}$  (1 Mol. Prolin, 1 Mol. *allo*-Hydroxy-prolin) zeigte, daß der unbekannte Baustein des Actinomycins  $X_2$  1) das Grundgerüst des Prolins enthält und 2) an dem zur Carboxygruppe  $\gamma$ -ständigen C-Atom ein Sauerstoffatom trägt, das bei katalytischer Hydrierung Bestandteil einer Hydroxygruppe wird. Zu klären blieb die Funktion dieses Sauerstoffatoms sowie die Frage, ob der unbekannte Baustein C-Doppelbindungen enthält. Beides gelang durch Reduktion des

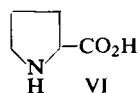
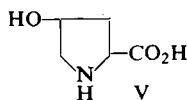
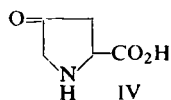
19) H. BROCKMANN und K. VOHWINKEL, Angew. Chem. 67, 619 [1955].

20) J. B. JEPSON und I. SMITH, Nature [London] 172, 1100 [1953].

21) TH. WIELAND und U. WINTERMEYER, Chem. Ber. 90, 1721 [1957].

Actinomycins  $X_2$  mit Aluminiumisopropylat. Aus der tiefgrünen Reaktionslösung konnten wir nämlich in 88-proz. Ausbeute ein kristallisiertes Actinomycin isolieren, dessen Totalhydrolysat neben den Aminosäuren des Actinomycins  $X_2$  Hydroxyprolin (V) enthielt (identifiziert durch  $R_F$ -Wert, Farbreaktion mit Isatin/*p*-Dimethylamino-benzaldehyd sowie  $R_F$ -Wert des Hochspannungs-Pherogramms<sup>21)</sup>).

Dieses Actinomycin stimmt im Aminosäuregehalt (je 2 Moll. Threonin, Valin, Sarkosin, *N*-Methyl-valin und je 1 Mol. Prolin und Hydroxy-prolin), C-, H-, N-Gehalt, Schmp., spezif. Drehung,  $R_F$ -Wert, antibiotischer Wirksamkeit, sowie in den Analysenzahlen und  $R_F$ -Werten seines kristallisierten Acetates und Palmitates mit Actinomycin  $X_{03}$  überein und ist demnach mit diesem identisch. Actinomycin  $X_{03}$  wurde vor einiger Zeit aus Actinomycingemischen X isoliert<sup>5,6)</sup>.



Damit war die Konstitution des unbekannten Actinomycin  $X_2$ -Bausteines aufgeklärt. Denn eine Verbindung, die bei energischer katalytischer Hydrierung in Prolin (VI), bei milder in *allo*-Hydroxy-prolin und bei Reduktion mit Aluminiumisopropylat in Hydroxy-prolin übergeht, konnte nur das kurze Zeit vor unseren Arbeiten von R. KUHN und G. OSSWALD<sup>22)</sup> synthetisierte  $\gamma$ -Oxo-prolin (IV) sein. Dafür, daß dieses Prolinderivat bisher in den Salzsäure-Totalhydrolysaten von Actinomycin  $X_2$  nicht gefunden wurde, ist offenbar der chromophore Molekülteil des Actinomycins  $X_2$  verantwortlich, dessen chinoide Gruppierung das  $\gamma$ -Oxo-prolin während der Salzsäure-Hydrolyse oxydiert oder anderweitig verändert. Denn als wir  $\gamma$ -Oxo-prolin (IV) bei Gegenwart der äquivalenten Menge Actinomycin  $X_2$  den Bedingungen der Salzsäure-Totalhydrolyse (48 Std., 110°) unterwarfen, war es nicht mehr nachzuweisen, wohl aber, wenn das Actinomycin fehlte.

Nach diesen Befunden war zu erwarten, daß  $\gamma$ -Oxo-prolin erhalten bleibt, wenn man Actinomycin  $X_2$  bei Gegenwart eines Reduktionsmittels hydrolysiert, das die Carbonylgruppe intakt läßt. Als dementsprechend Actinomycin  $X_2$  4 Stdn. mit 57-proz. Jodwasserstoffsäure auf 100° erhitzt wurde, zeigte das Papierchromatogramm des von Jod-Ionen befreiten Hydrolysates eine mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid rot werdende Zone mit dem  $R_F$ -Wert des  $\gamma$ -Oxo-prolin-hydrochlorides.

Die Carbonylgruppe des  $\gamma$ -Oxo-prolins hat in KBr eine Bande bei 5.65  $\mu$ <sup>22)</sup>. Im IR-Spektrum des Actinomycins  $X_2$  gibt sich diese Bande des  $\gamma$ -Oxo-prolins durch eine bei 5.65  $\mu$  liegende Schulter der starken Lacton-carbonylbande zu erkennen, die bei den anderen Actinomycinen fehlt.

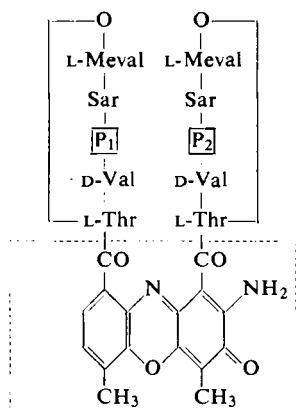
Die Feststellung, daß Actinomycin  $X_2$  1 Mol.  $\gamma$ -Oxo-prolin und somit ebenso wie die anderen Actinomycine zehn Peptidbausteine enthält, beseitigt die oben erörterte Diskrepanz zwischen dem gefundenen und dem für neun Peptidbausteine berechneten Mol.-Gew. Denn unter Berücksichtigung des  $\gamma$ -Oxo-prolin-Gehaltes berechnet sich in der oben angeführten Weise für Actinomycin  $X_2$  die Bruttoformel  $C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$

<sup>22)</sup> R. KUHN und G. OSSWALD, Chem. Ber. 89, 1423 [1956].

mit dem Mol.-Gew. 1269.5, und damit stimmt der durch Vergleich der Extinktionen von Actinomycin C<sub>3</sub> (I) und Actinomycin X<sub>2</sub> ermittelte Wert  $1265 \pm 10$  gut und der durch Redoxitration gefundene  $1307 \pm 35$  befriedigend überein. Das gleiche gilt für die C-, H- und N-Zahlen der Elementaranalyse.

Daß Actinomycin X<sub>2</sub> zu den Actinomycinen X<sub>08</sub>, X<sub>08</sub> und C<sub>1</sub> reduziert werden kann, enthüllt die strukturelle Ähnlichkeit der vier Chromopeptide und erlaubt, die für die Konstitutionsermittlung von Actinomycin C<sub>1</sub> und Actinomycin C<sub>3</sub> aufgewandte Arbeit für die Strukturermittlung der Actinomycine X<sub>08</sub>, X<sub>08</sub> und X<sub>2</sub> auszunutzen.

Für Actinomycin C<sub>1</sub> ist durch unseren Arbeitskreis die Formel VII ermittelt worden<sup>23)</sup>, bei der bis vor kurzem die Stellung der Lactongruppen noch nicht gesichert war. Denn es ließ sich zunächst nicht ausschließen, daß die Lactongruppen zwischen dem N-Methylvalinrest der einen und dem Threoninrest der anderen Kette liegen. Nachdem inzwischen jedoch beim Actinomycin C<sub>3</sub> die in Formel I angenommene Lage der Lactongruppen bewiesen werden konnte<sup>18)</sup>, darf als so gut wie sicher gelten, daß die gleiche Anordnung auch im Actinomycin C<sub>1</sub> vorliegt und diesem daher die Konstitution VII zukommt.



VII: P<sub>1</sub> = P<sub>2</sub> = L-Prolin

VIIIa: P<sub>1</sub> = L-Prolin; P<sub>2</sub> = L-γ-Oxo-prolin

VIIIb: P<sub>1</sub> = L-γ-Oxo-prolin; P<sub>2</sub> = L-Prolin

IXa: P<sub>1</sub> = L-Prolin; P<sub>2</sub> = L-*allo*-Hydroxy-prolin

IXb: P<sub>1</sub> = L-*allo*-Hydroxy-prolin; P<sub>2</sub> = L-Prolin

Xa: P<sub>1</sub> = L-Prolin; P<sub>2</sub> = L-Hydroxy-prolin

Xb: P<sub>1</sub> = L-Hydroxy-prolin; P<sub>2</sub> = L-Prolin

Da sich Actinomycin X<sub>2</sub> zu Actinomycin C<sub>1</sub> (VII) reduzieren läßt, muß sein γ-Oxo-prolinrest in einer der beiden Peptidlactongruppen an gleicher Stelle stehen wie einer der beiden Prolinreste des Actinomycins C<sub>1</sub>, im übrigen aber sowohl die Struktur der Peptidgruppen und des Chromophors<sup>24)</sup> als auch die Konfiguration der Peptidbausteine die gleiche sein wie in VII. Oder anders ausgedrückt: Actinomycin X<sub>2</sub> ist ein Derivat des Actinomycins C<sub>1</sub> (VII), das am γ-C-Atom eines der beiden Prolinreste ein Oxo-Sauerstoffatom trägt. Danach stehen für Actinomycin X<sub>2</sub> nur noch die beiden Formeln VIIIa und VIIIb zur Diskussion. Die Entscheidung zwischen ihnen ist von einem oxydativen Abbau zu erwarten, bei dem mindestens eine der beiden Peptidgruppen als Abbauprodukt gefaßt wird und aus der Konstitution des an der Peptid-

<sup>23)</sup> H. BROCKMANN, P. BOLDT und H.-S. PETRAS, *Naturwissenschaften* **47**, 62 [1960].

<sup>24)</sup> Für den Chromophor war die gleiche Struktur bereits durch Abbau zum Despeptido-actinomycin bekannt; vgl. l. c. <sup>11,6)</sup>.

gruppe hängenden Restes zu erkennen ist, ob er dem chinoiden oder benzoiden Ring des Chromophors entstammt<sup>25)</sup>.

Da Actinomycin  $X_2$  auch zu Actinomycin  $X_{03}$  und Actinomycin  $X_{08}$  reduziert werden kann, muß im Actinomycin  $X_{03}$  der Hydroxyprolin-Rest und im Actinomycin  $X_{08}$  der *allo*-Hydroxyprolin-Rest an gleicher Stelle stehen wie der  $\gamma$ -Oxo-prolin-Rest des Actinomycins  $X_2$ , im übrigen aber die Struktur der Peptidgruppen, die Konfiguration der Peptidbausteine und die Konstitution des Chromophors<sup>24)</sup> die gleiche sein wie beim Actinomycin  $X_2$  (VIIIa, b) und Actinomycin  $C_1$  (VII). Um die Konstitution der drei Actinomycine vollends aufzuklären, würde es somit genügen, bei einem von ihnen zu ermitteln, welche Peptidgruppe das Prolinderivat enthält. Solange das nicht gelungen ist, stehen für Actinomycin  $X_{08}$  die Formeln IXa und IXb und für Actinomycin  $X_{03}$  die Formeln Xa und Xb zur Diskussion.

Actinomycin  $X_{03}$  und  $X_{08}$  sind Diastereomere. Sie unterscheiden sich in der Konfiguration desjenigen C-Atoms, das im Hydroxyprolin-Rest bzw. *allo*-Hydroxyprolin-Rest die Hydroxygruppe trägt. Dieser geringfügige Unterschied reicht aus, um deutliche Differenzen in antibiotischer Wirksamkeit, Löslichkeit und  $R_F$ -Werten hervorzurufen. So ist z. B. in 95-proz. Methanol die Löslichkeit von Actinomycin  $X_{08}$  3.5 mal größer als die von Actinomycin  $X_{03}$  und bei *B. subtilis* die antibiotisch wirksame Grenzkonzentration von Actinomycin  $X_{08}$  etwa zehnmal kleiner als die von Actinomycin  $X_{03}$ . Auch beim Acetat beider Verbindungen findet man entsprechende Unterschiede in der antibiotischen Wirksamkeit.

Wie sich im Laufe unserer Untersuchungen herausgestellt hat, enthalten die Actinomycin-gemische X auch Actinomycin  $C_1$ , die Stammverbindung der Actinomycine  $X_2$ ,  $X_{03}$  und  $X_{08}$ . Es wurde bereits bei den ersten Trennungsversuchen aus Actinomycin-gemischen X kristallisiert isoliert, jedoch nicht als solches erkannt, sondern für ein Isomeres des Actinomycins  $C_1$  gehalten und zunächst Actinomycin  $X_1$  genannt<sup>4)</sup>. Ein eingehender Vergleich hat später gezeigt, daß Actinomycin  $X_1$  mit Actinomycin  $C_1$  identisch<sup>26)</sup> und die Bezeichnung Actinomycin  $X_1$  daher zu streichen ist.

Verwendet man bei der mit Platin katalysierten Hydrierung des Actinomycins  $X_2$  als Lösungsmittel Methanol statt Eisessig, so geht die Reduktion des  $\gamma$ -Oxo-prolins nicht über die Hydroxy-Stufe hinaus. Aus dem Hydrierungsprodukt konnten wir nach Luftoxydation (Reaktion III  $\rightarrow$  II) in 85-proz. Ausbeute krist. Actinomycin  $X_{08}$  gewinnen. Als Nebenprodukt entstand eine Verbindung mit den  $R_F$ -Werten des Actinomycins  $X_{03}$ , ein Zeichen, daß das L- $\gamma$ -Oxo-prolin (XIa) des Actinomycins  $X_2$  in geringem Umfang offenbar auch zu L-Hydroxy-prolin (XIIIa) hydriert wird.

Bemerkenswert ist, daß Actinomycin  $X_{08}$  in den zur Trennung von Actinomycin  $C_1$ ,  $C_2$  und  $C_3$  bewährten Lösungsmittel-Systemen Butylacetat/10-proz. wäBr. Natrium-*m*-kresotinat oder Butylacetat/Dibutyläther (3:1)/10-proz. wäBr. Natrium-*m*-kresotinat den gleichen  $R_F$ -Wert hat wie diejenige Fraktion des Actinomycin-gemisches X, die wir zunächst für ein Isomeres des Actinomycins  $C_1$  hielten und Actinomycin  $X_1$  genannt haben. Bei

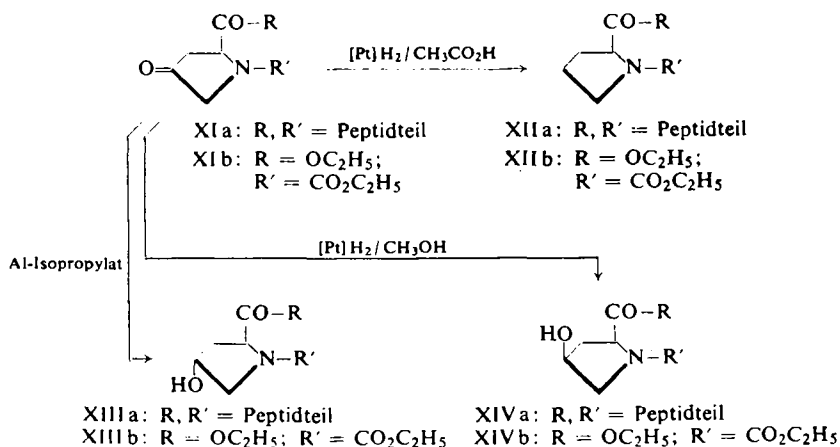
<sup>25)</sup> Nicht außer acht zu lassen ist die Möglichkeit, daß die Actinomycin- $X_2$ -Präparate Gemische der beiden Isomeren VIIIa und VIIIb sind, die in den bisher verwendeten Lösungsmittelsystemen nicht durch Verteilungschromatographie zu trennen sind. Auch diese Frage wird sich durch den oben erwähnten oxydativen Abbau entscheiden lassen.

<sup>26)</sup> G. DÖRING, Diplomarbeit Univ. Göttingen 1957.

unseren ersten Versuchen, bei denen das in Methanol hydrierte Actinomycin  $X_2$  nur papierchromatographisch in diesen beiden Systemen untersucht wurde, schien es daher so, als sei als Hauptprodukt Actinomycin  $C_1$  oder „Actinomycin  $X_1$ “ entstanden<sup>10)</sup>. Als wir dann aber das Hydrierungsprodukt im System Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther (2:1:7)/7-proz. wäBr. Natrium-*m*-kresotinat<sup>27)</sup> chromatographierten, zeigte sich, daß die katalytische Hydrierung nicht zum Actinomycin  $C_1$ , sondern zum Actinomycin  $X_{08}$  führt; denn in diesem System hat das Actinomycin  $X_{08}$  einen kleineren  $R_F$ -Wert als Actinomycin  $C_1$ .

Actinomycin  $X_2$  ist als Hauptkomponente von Actinomycingemischen  $X$  gut zugänglich. Actinomycin  $X_{08}$  dagegen findet sich in solchen Gemischen nur in geringer Menge und Actinomycin  $X_{08}$  ist bisher noch nicht kristallisiert aus *Streptomyces*-Kulturen isoliert worden. Da nach unseren Befunden beide Actinomycine leicht und in guter Ausbeute aus Actinomycin  $X_2$  zu gewinnen sind, läßt sich jetzt prüfen, wie weit ihre biologische Wirksamkeit durch Veresterung ihres Hydroxy-prolin- bzw. *allo*-Hydroxy-prolin-Restes verändert wird. Dargestellt haben wir bisher das Monoacetat und Monopalmitat beider Actinomycine. Während sich Actinomycin  $X_{08}$  im Ring-Papierchromatogramm durch seinen kleineren  $R_F$ -Wert deutlich von seinem Monoacetat unterscheidet, zeigten Actinomycin  $X_{08}$  und sein Monoacetat in den bisher von uns untersuchten Lösungsmittel-Systemen den gleichen  $R_F$ -Wert. Wie zu erwarten, gelingt ihre Trennung jedoch durch Chromatographie an Aluminiumoxyd, an dem das Actinomycin  $X_{08}$  dank seiner freien Hydroxygruppe fester adsorbiert wird als das Acetat.

Die Reduktion des  $\gamma$ -Oxo-prolins (IV) ist zuerst von R. KUHN und G. OSSWALD<sup>22)</sup> am Beispiel des DL-*N*-Carbäthoxy- $\gamma$ -oxo-prolin-äthylesters (L-Form: XIb) untersucht worden. Wie ein Vergleich ihrer Ergebnisse mit unseren zeigt, verläuft im Peptid-



verband des Actinomycins  $X_2$  die Reduktion des  $\gamma$ -Oxo-prolins mit Aluminiumisopropylat sterisch anders als die des DL-*N*-Carbäthoxy- $\gamma$ -oxo-prolin-äthylesters

<sup>27)</sup> G. SCHMIDT-KASTNER, „Medizin und Chemie“, „Bayer“ Leverkusen, Verlag Chemie, Weinheim 1956, Bd. V, S. 463.

(L-Form: XIb). Denn während sie beim Actinomycin  $X_2$  (VIIIa, b) vom L- $\gamma$ -Oxo-prolin-Rest (XIa) überwiegend zum L-Hydroxy-prolin-Rest (XIIIa) führt (Bildung von Actinomycin  $X_{08}$  (Xa, b)), entsteht bei der Reduktion von DL-*N*-Carbäthoxy- $\gamma$ -oxo-prolin-äthylester (L-Form: XIb) etwa doppelt soviel DL-*allo*-Hydroxy-prolinderivat (L-Form: XIVb) wie DL-Hydroxy-prolinderivat (L-Form: XIIIb).

Sterisch gleichartig verläuft dagegen die Reduktion der Carbonylgruppe bei der katalytischen Hydrierung in Methanol. Sie führt beim DL-*N*-Carbäthoxy- $\gamma$ -oxo-prolin-äthylester (L-Form: XIb) ausschließlich und beim Actinomycin  $X_2$  (VIIIa, b) fast ausschließlich zur *allo*-Verbindung (L-Form: XIVb bzw. a; Bildung von Actinomycin  $X_{08}$  (IXa, b)).

Auch in Eisessig ist der Verlauf der Hydrierung analog. Denn sowohl im DL-*N*-Carbäthoxy- $\gamma$ -oxo-prolin-äthylester (L-Form: XIb) als auch im Actinomycin  $X_2$  (VIIIa, b) wird der  $\gamma$ -Oxo-prolin-Rest zum Prolin-Rest reduziert.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, dem FONDS DER CHEMIE und den FARBEN-FABRIKEN BAYER danken wir für Förderung unserer Arbeiten.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Isolierung von Actinomycin  $X_2$* : 550 l der früher angegebenen Nährlösung<sup>6)</sup> wurden auf 550 P-Kolben verteilt, sterilisiert, mit einer Vorkultur des Stammes Wind 731 beimpft und 4 Wochen bei 28° gehalten. Die vom Mycel abfiltrierte Kulturlösung rührte man 3 Stdn. mit 140 l Butylacetat, saugte den Butylacetatauszug ab und gewann aus der zwischen beiden Phasen liegenden Emulsionsschicht den Rest der Butylacetat-Phase durch Zentrifugieren. Die nur noch wenig Actinomycin enthaltende wäbr. Phase wurde verworfen; desgleichen das Mycel, das an Aceton nur sehr geringe Mengen Actinomycin abgab.

Den im Umlaufverdampfer auf 3 l eingeengten Butylacetatauszug verdampfte man i. Vak. zur Sirupkonsistenz, nahm den Rückstand in 200 ccm Aceton auf und versetzte bei Siedehitze mit 800 ccm Petroläther. Den Niederschlag fällte man noch zweimal in gleicher Weise, wobei die hellgelben Filtrate verworfen wurden.

Das so gewonnene Rohprodukt (91 g) chromatographierte man in Anteilen von 5 g im System Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) an Cellulosepulver-Säulen (4.5  $\times$  70 cm), schnitt die breite Hauptzone heraus und verdampfte ihr Acetoneluat i. Vak. Die Benzollösung des Rückstandes, die zur Entfernung von *m*-Kresotinsäure und deren Natriumsalz mit 0.5-proz. wäbr. Natriumhydrogencarbonat und dann mit Wasser gewaschen war, hinterließ beim Verdampfen 26.7 g amorphes Actinomycin  $X_2$ , das aus heißem Chloroform nach Zugabe von Ligroin in gelbroten Nadeln (22.5 g) kristallisierte.

Den Verdampfungsrückstand der Mutterlauge nahm man in Benzol auf, gab die Lösung auf eine Säule aus Aluminiumoxyd (IV), wusch mit Benzol nach und eluierte mit Aceton. Die Säule blieb hellgelb und fluoreszierte im UV-Licht intensiv grün. Das beim Verdampfen des Acetoneluates hinterbleibende Actinomycin  $X_2$  kristallisierte aus siedendem Chloroform nach Zugabe von Ligroin. Ausb. 2.4 g.

Zur Analyse und Bestimmung der physikalischen Konstanten diente ein zweimal umkristallisiertes, 12 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknetes Präparat. Schmp. 249.5–250.5° (Zers., BERL-Block, kor.).  $[\alpha]_D^{24}$ :  $-359 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-288 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $24700 \pm 400$  (in Methanol). Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur



Verdünnung  $1:12 \times 10^6$ . Der gleiche Stamm wurde durch Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$  gehemmt.

$C_{62}H_{84}N_{12}O_{17}$  (1269.5) Ber. C 58.73 H 6.82 N 13.30 Gef. C 58.66 H 6.67 N 13.24

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. Mol\*) Thr 1.3 Val 1.8 Pro 1.1 Sar 1.7 Meval 1.9

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6 *n* HCl bei 110° hydrolysiert.

*Nachweis von  $\gamma$ -Oxo-prolin im Actinomycin X<sub>2</sub>*: Eine Mischung von 50 mg Actinomycin X<sub>2</sub>, 500 mg Quecksilber und 3 ccm 57-proz. Jodwasserstoffsäure erhitzte man 4 Stdn. unter Stickstoff auf dem Dampfbad, verdampfte i. Vak. und nahm den Rückstand in 2 ccm Wasser auf. Das Filtrat wurde über Nacht mit 1 g frisch gefälltem Silberchlorid geschüttelt und der abfiltrierte Niederschlag mit 1 ccm Wasser gewaschen. 30 cmm des Filtrates trug man zusammen mit 30 cmm einer Vergleichslösung auf den Startkreis eines Ringchromatogrammes auf. Nach 8 stdg. Laufzeit im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:7) besprühte man das an der Luft getrocknete Papier mit einem frisch bereiteten Gemisch aus 2-proz. wäbr. Triphenyl-tetrazoliumchlorid und *n* NaOH (1:1) und erwärmte 5 Min. in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre auf 40°. Die dabei entstehende intensiv rote Zone des Hydrolysates hatte den gleichen *R<sub>F</sub>*-Wert wie die rote Zone des  $\gamma$ -Oxo-prolins.

*Überführung von Actinomycin X<sub>2</sub> in Actinomycin C<sub>1</sub>*: 1 g Actinomycin X<sub>2</sub> (krist., fein gepulvert und 3 Stdn. i. Hochvak. bei 110° getrocknet) und 1 g Platinoxid (Degussa) wurden in 150 ccm Eisessig (p. a.) unter Wasserstoff geschüttelt, bis nach 6½ Stdn. die Gasaufnahme beendet war. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung verdampfte man bei 25° i. Vak. und trocknete den Rückstand bei gleicher Temperatur i. Hochvak. Als dieses Produkt (960 mg;  $\epsilon_{443} \mu\mu$ : 14.3, in Methanol) an einer Cellulosesäule (4 × 60 cm) im System Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) chromatographiert wurde, bildete sich eine breite und eine darüber liegende schwächere Zone, deren Inhaltsstoffe mit Aceton eluiert und, wie oben beim Actinomycin X<sub>2</sub> beschrieben, von *m*-Kresotinsäure und deren Natriumsalz befreit wurden.

Als der Inhaltsstoff der Hauptzone (546 mg) aus Benzol an einer Säule (2.4 × 60 cm) aus Aluminiumoxyd (II) adsorbiert und mit Äthylacetat nachgewaschen wurde, bildeten sich zwei Zonen. Das aus der unteren Zone mit Aceton eluierte Actinomycin C<sub>1</sub> kristallisierte aus Chloroform/Ligroin in roten Prismen, die zur Entfernung von eingeschlossenem Lösungsmittel fein gepulvert 9 Stdn. i. Hochvak. auf 110° erhitzt wurden. Ausb. 21% d. Th. Schmp. 246–247° (Zers., BERL-Block, korr.).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-335 \pm 5^\circ$  (*c* = 0.2, in Methanol).  $\epsilon_{443} \mu\mu$ :  $24700 \pm 400$  (in Methanol). Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$ . Gegen den gleichen Stamm war Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$  antibiotisch wirksam.

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$  (1255.5) Ber. C 59.31 H 6.91 N 13.39 Gef. C 59.40 H 7.07 N 13.19

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. Mol\*) Thr 1.3 Val 1.8 Pro 1.9 Sar 1.9 Meval 1.9

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6 *n* HCl bei 110° hydrolysiert.

Das aus der oberen Zone des Aluminiumoxyd-Chromatogrammes mit Aceton eluierte Actinomycin X<sub>08</sub> (274 mg) kristallisierte aus Chloroform/Ligroin in roten Prismen vom Schmp. 245–246° (Zers., BERL-Block, korrig.). Ausb. 22% d. Th. Zur Analyse und Messung der spezif. Drehung und Extinktion wurde dieses Präparat aus Benzol an Aluminiumoxyd (IV) adsorbiert und nach gründlichem Nachwaschen mit Benzol/Aceton (1:1) wieder eluiert. Den Verdampfungsrückstand des Eluates nahm man in Aceton auf, verdampfte i. Vak. zur Trockene, wiederholte diese Operation noch zweimal und trocknete dann 11 Stdn. i. Hochvak. bei 110°.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-297 \pm 5^\circ$  (*c* = 0.2, in Methanol);  $-241 \pm 5^\circ$  (*c* = 0.2, in Aceton).  $\epsilon_{443} \mu\mu$ :

24300  $\pm$  400 (in Methanol). Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:4 \times 10^6$ . Das Wachstum des gleichen Stammes wurde von Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$  gehemmt.

C<sub>62</sub>H<sub>86</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1271.5) Ber. C 58.57 H 6.82 N 13.22 Gef. C 58.10 H 7.07 N 12.98

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 *allo*-Hypro 1.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. Mol\*) Thr 1.2 Val 1.9 Pro 1.0 *allo*-Hypro 1.0 Sar 1.9 Meval 2.0

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6 *n* HCl bei 110° hydrolysiert.

*Überführung von Actinomycin X<sub>2</sub> in Actinomycin X<sub>08</sub>.* a) *Mikrohydrierung:* Zu einer Suspension von 117 mg Actinomycin X<sub>2</sub> (kristallisiert, gepulvert, 5 Stdn. i. Hochvak. bei 110° getrocknet) in 2 ccm Methanol gab man eine vorher aushydrierte Suspension von 125 mg Platinoxid in 4 ccm Methanol und schüttelte unter Wasserstoff. Nach 15 Min. waren 1 Mol verbraucht und nach 2½ Stdn., als die Gasaufnahme beendet war, 1.9 Mol. Der Verdampfungsrückstand der vom Katalysator abfiltrierten Reaktionslösung bildete im Ringchromatogramm (Butylacetat/Dibutyläther (3:1)/7.5-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat) drei Zonen, die ausgeschnitten und mit 50-proz. Methanol eluiert wurden. Die photometrische Auswertung der Eluate (Photometer EPPENDORF, Filter Hg 436) ergab, daß das Reaktionsprodukt 92.5% Actinomycin X<sub>08</sub>, 3.4% Actinomycin X<sub>03</sub> und 4.1% einer actinomycingelben Substanz enthielt, die am Startkreis des Papierchromatogrammes zurückblieb.

b) *Präparative Hydrierung:* 1 g Actinomycin X<sub>2</sub> (krist., feingepulvert und 3 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet) wurden mit 1 g Platinoxid in 200 ccm Methanol (p.a.) unter Wasserstoff bis zur Sättigung geschüttelt, was 5–7 Stdn. dauerte. Die nach Abfiltrieren des Katalysators aus fünf Ansätzen erhaltene Reaktionslösung wurde i. Vak. verdampft und der Rückstand im System Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat an einer Cellulosepulver-Säule (5  $\times$  60 cm) chromatographiert. Dabei bildeten sich 4 Zonen (im folgenden von oben nach unten beziffert), deren Inhaltsstoffe mit Aceton eluiert und, wie oben beschrieben, von *m*-Kresotinsäure und deren Natriumsalz befreit wurden. Zone 1) 240 mg; gelbes Produkt, das nur Spuren von Actinomycinen enthielt. Zone 2) 177 mg; dem Papierchromatogramm nach ein Gemisch aus 93% Actinomycin X<sub>03</sub> und 7% Actinomycin X<sub>08</sub>. Zone 3) 4.38 g; chromatographisch einheitliches Actinomycin X<sub>08</sub>. Zone 4) 414 mg; gab im Ringchromatogramm zwei Zonen mit den *R<sub>F</sub>*-Werten von Actinomycin X<sub>08</sub> und Actinomycin X<sub>2</sub>.

Das Actinomycin X<sub>08</sub> aus Zone 3 kristallisierte aus Chloroform/Ligroin in roten Prismen vom Schmp. 245–246° (Zers., BERL-Block, korr.). Ausb. 4.2 g.

Zur Analyse und Bestimmung der physikalischen Konstanten wurde die Benzollösung des krist. Präparates durch eine Säule aus Aluminiumoxyd (IV) filtriert, mit Benzol nachgewaschen und die Actinomycin-Zone mit Benzol/Aceton (1:1) eluiert. Nachdem man den Verdampfungsrückstand des Eluates in Aceton aufgenommen, das Lösungsmittel verdampft und diese Operation noch zweimal wiederholt hatte, wurde 12 Stdn. i. Hochvak. bei 110° getrocknet.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-300 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-248 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ : 25000  $\pm$  400 (in Methanol). Wirksam gegen *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:4 \times 10^6$ . Der gleiche Stamm wurde durch Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung  $1:8 \times 10^6$  gehemmt.

C<sub>62</sub>H<sub>86</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1271.5) Ber. C 58.57 H 6.82 N 13.22 Gef. C 58.32 H 6.94 N 13.02

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 *allo*-Hypro 1.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. Mol\*) Thr 1.2 Val 1.9 Pro 1.0 *allo*-Hypro 1.0 Sar 1.8 Meval 1.8

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6 *n* HCl bei 110° hydrolysiert.

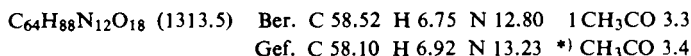
*Nachweis von allo-Hydroxy-prolin im Actinomycin X<sub>08</sub>.* a) *Im Papierchromatogramm:* Eine Lösung von 2 mg Actinomycin X<sub>08</sub> in 2 ccm 6 *n* HCl erhitzte man im zugeschmolzenen

Röhrchen 48 Stdn. auf 110°, extrahierte den schwarzen Verdampfungsrückstand des Hydrolysates mit 0.4 ccm Wasser und chromatographierte 0.02 ccm des Auszuges zusammen mit 0.02 ccm einer Vergleichslösung (enthaltend 2.5 mg *D-allo*-Hydroxy-prolin, Nutritional Biochemicals Co, in 5 ccm Wasser) im Ringverfahren im System Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:7). Als der getrocknete Bogen mit Isatinlösung [0.3-proz. Lösung von Isatin in Butanol/Eisessig (24:1)] besprüht und 5 Min. auf 110° erhitzt wurde, bildete sich eine blaue Prolin-Zone und eine schwach-blaue Zone mit kleinerem  $R_F$ -Wert, die das *allo*-Hydroxy-prolin enthielt. Anschließend badete man den Bogen 15 Sek. in einer frisch bereiteten 1-proz. Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in Aceton/konz. Salzsäure (9:1) und trocknete an der Luft. Während die blaue Farbe der Prolin-Zone schnell verschwand, färbte sich die vorher schwach-blaue *allo*-Hydroxy-prolin-Zone allmählich purpurrot.

b) *Nachweis im Hochspannungs-Pherogramm*: 20 cmm des wäbr. Hydrolysatauszuges, 20 cmm einer wäbr. Lösung von *D-allo*-Hydroxy-prolin und 20 cmm einer gleichen Lösung von *L*-Hydroxy-prolin (Fluka) (beide Vergleichslösungen enthielten 2.5 mg Iminosäure in 2.5 ccm) brachte man auf 3 cm breite, in Abständen von 2 cm nebeneinander liegende Startlinien eines Filtrierpapier-Streifens, der mit Ameisensäure-Eisessigpuffer ( $pH$  1.9) befeuchtet war, und legte 2 400 Volt/40 cm (Pherograph Frankfurt) an. Nach 1½ Stdn. wurde an der Luft getrocknet und mit Isatin und *p*-Dimethylamino-benzaldehyd, wie oben beschrieben, entwickelt. Die rote Zone des Hydrolysates hatte die gleiche Lage wie die des *D-allo*-Hydroxy-prolins.

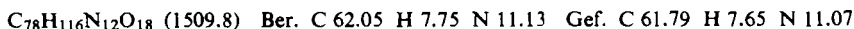
*Actinomycin X<sub>08</sub>-monoacetat*: Zu einer Lösung von 1 g Actinomycin X<sub>08</sub> in 50 ccm Benzol gab man unter Kühlung nacheinander 0.8 ccm Pyridin und 6 ccm Acetylchlorid. Nach 15 stdg. Schütteln wurde das Reaktionsgemisch durch eine G 3-Fritte gesaugt und das Filtrat bei 50° i. Vak. eingedampft.

Den Rückstand löste man in 50 ccm Benzol, gab die Lösung auf eine Säule (2.2 × 16 cm) aus Aluminiumoxyd (II), wusch mit Äthylacetat nach und verdampfte das Eluat i. Vak. Das zurückbleibende Actinomycin X<sub>08</sub>-monoacetat kristallisierte aus Methanol/Wasser in dünnen rhombischen Blättchen, die 14 Stdn. i. Hochvak. bei 110° getrocknet wurden. Schmp. 249–250° (Zers., BERL-Block, kor.).  $[\alpha]_D^{18}$ : –310 ± 5° ( $c$  = 0.2, in Methanol); –279 ± 5° ( $c$  = 0.2, in Aceton)  $\epsilon_{444}$  = 24900 ± 400 (in Methanol). Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung 1:1 × 10<sup>6</sup>. Der gleiche Stamm wurde durch Actinomycin C<sub>3</sub> bis zur Verdünnung 1:8 × 10<sup>6</sup> gehemmt.



\*) 2 Stdn. mit siedender  $n$  NaOH (50% Methanol enthaltend) unter Stickstoff verseift.

*Actinomycin X<sub>08</sub>-monopalmitat*: Zu einer Lösung von 1 g Actinomycin X<sub>08</sub> in 25 ccm Chloroform gab man unter Eiskühlung nacheinander 6 ccm Pyridin und 6 ccm Palmitoylchlorid, verdünnte nach 20 Min. mit 25 ccm Benzol und filtrierte durch eine Säule (2 × 20 cm) von Aluminiumoxyd (II). Durch Nachwaschen mit Benzol/Äthylacetat (1:1) brachte man alle farbigen Anteile ins Filtrat, verdampfte i. Vak. und befreite den Rückstand i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> von Pyridin. Seine Lösung in Benzol/Ligroin (1:2) gab man auf eine Säule (2 × 30 cm) von Aluminiumoxyd (II), wusch gründlich mit dem gleichen Lösungsmittel nach und eluierte mit Aceton. Der Verdampfungsrückstand des Acetoneluates kristallisierte aus Methanol/Wasser in gelbroten Prismen. Nach 10 stdg. Trocknen i. Hochvak. bei 110° Schmp. 200 bis 201° (Zers., BERL-Block, kor.).  $[\alpha]_D^{18}$ : –256 ± 5° ( $c$  = 0.2, in Methanol); –224 ± 5° ( $c$  = 0.2, in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ : 24700 ± 400 (in Methanol).



**Reduktion von Actinomycin  $X_2$  zu Actinomycin  $X_{08}$ :** Eine Mischung von 5 g Actinomycin  $X_2$ , 45 g Aluminiumisopropylat, 250 ccm Benzol und 700 ccm absol. Isopropylalkohol hielt man 24 Stdn. unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit am Sieden und gab zur erkalteten, tiefgrünen Lösung 250 ccm Chloroform und 350 ccm 2 n  $H_2SO_4$  (Farbumschlag nach Rot). Nach Abtrennung der Chloroformschicht schüttelte man die wäßr. Phase mit Chloroform, verdampfte die vereinigten Chloroformauszüge zur Trockene und chromatographierte den Rückstand im System Butylacetat/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (mit *m*-Kresotinsäure gesättigt). Dabei bildeten sich (von oben nach unten beziffert) vier Zonen, deren Inhaltsstoffe mit Aceton eluiert, wie oben beschrieben, von *m*-Kresotinsäure sowie deren Natriumsalz befreit wurden.

**Zone 1,** 45 mg; Produkt ließ sich aus Benzol mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat ausschütteln. **Zone 2,** 4,39 g; aus Chloroform/Ligroin kristallisierendes Actinomycin  $X_{08}$  vom Schmp. 244–245° (Zers., BERL-Block, kor.). **Zone 3,** 500 mg; Substanz zeigte im Papierchromatogramm (Butylacetat/Dibutyläther (3:1)/7.5-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, mit *m*-Kresotinsäure gesättigt) zwei Zonen mit den  $R_F$ -Werten von Actinomycin  $X_{08}$  und  $X_{09}$ . **Zone 4,** 68 mg; enthielt dem Papierchromatogramm nach die Actinomycine  $X_2$  und  $X_{08}$ .

Für die Analysen und die Bestimmung der physikalischen Konstanten wurde das kristallisierte Actinomycin  $X_{08}$  aus Zone 2 ebenso wie oben für Actinomycin  $X_{08}$  beschrieben an Aluminiumoxyd chromatographiert und in amorpher Form 10 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-308 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-265 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25000 \pm 400$  (in Methanol).

Das Wachstum von *B. subtilis* wurde bis zur Verdünnung  $1:2.6 \times 10^5$  gehemmt. Gegen den gleichen Stamm war Actinomycin  $C_3$  bis zur Verdünnung  $1:1.3 \times 10^7$  wirksam.

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$  (1271.5) Ber. C 58.57 H 6.82 N 13.22 Gef. C 58.43 H 6.90 N 13.03

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 1.0 Hypo 1.0 Sar 2.0 Meval 2.0

Gef. Mol\*) Thr 1.2 Val 1.8 Pro 1.0 Hypo 1.0 Sar 1.9 Meval 2.0

\*) Nach katalyt. Hydrierung 48 Stdn. mit 6 n HCl bei 110° hydrolysiert.

**Actinomycin  $X_{08}$ -monoacetat:** 1 g des durch Reduktion mit Aluminiumisopropylat aus Actinomycin  $X_2$  erhaltenen Actinomycin  $X_{08}$  wurde wie früher beschrieben acetyliert. Das aus Äthylacetat kristallisierte Monoacetat wurde 10 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet. Schmp. 242–243° (Zers., BERL-Block, kor.), Misch-Schmp. mit dem Monoacetat des nativen Actinomycins  $X_{08}$  243–244° (Zers., BERL-Block, kor.).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-283 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-260 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $24300 \pm 400$  (in Methanol).

Wachstumshemmung von *B. subtilis* bis zur Verdünnung  $1:1 \times 10^5$ . Der gleiche Stamm wurde durch Actinomycin  $C_3$  bis zur Verdünnung  $1:1.3 \times 10^7$  gehemmt.

$C_{64}H_{88}N_{12}O_{18}$  (1313.5) Ber. C 58.52 H 6.75 N 12.80 1  $CH_3CO$  3.3

Gef. C 58.25 H 6.88 N 12.43  $CH_3CO$ \*) 2.8

\*) 2 Stdn. mit siedender n NaOH (50% Methanol enthaltend) unter Stickstoff verseift; 0.2% Blindwert des nicht veresterten Actinomycins  $X_{08}$  abgezogen.

**Actinomycin  $X_{08}$ -monopalmitat:** 1 g des durch Reduktion mit Aluminiumisopropylat aus Actinomycin  $X_2$  erhaltenen Actinomycins  $X_{08}$  wurde, wie bei der Darstellung des Actinomycin  $X_{08}$ -monopalmitates beschrieben, mit Palmitoylchlorid umgesetzt. Das aus Äthylacetat/Ligroin kristallisierte Monopalmitat wurde 10 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet. Schmp. 201–203° (Zers., BERL-Block, kor.). Misch-Schmp. mit Monopalmitat des nativen Actinomycins  $X_{08}$  200–201° (Zers., BERL-Block, kor.).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-238 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Methanol);  $-221 \pm 5^\circ$  ( $c = 0.2$ , in Aceton).  $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ :  $25000 \pm 400$  (in Methanol).

$C_{78}H_{116}N_{12}O_{18}$  (1509.8) Ber. C 62.05 H 7.75 N 11.13 Gef. C 61.53 H 7.71 N 11.35