

HANS BROCKMANN, ENNO SPOHLER und THOMAS WAEHNELDT

Rhodosamin, Isolierung, Konstitution und Konfiguration

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 31. Mai 1963)

Aus Hydrolysaten von Rhodomycingemischen wurde die Tridesoxy-dimethylamino-hexose Rhodosamin $C_8H_{17}NO_3$ als kristallisiertes Hydrochlorid isoliert. Wäßr. Bariumhydroxid verwandelt Rhodosamin in 2-Desoxy-L-fucose und L-Bovinose. Dieser Befund zusammen mit dem NMR-Spektrum der beiden anomeren Rhodosamin-diacetate zeigt, daß Rhodosamin die 2.3.6-Tridesoxy-3-dimethylamino-L-*lyxo*-hexose ist.

Vor einiger Zeit wurde aus Hydrolysaten von Rhodomycin A und B eine Rhodosamin genannte Tridesoxy-dimethylamino-hexose isoliert¹⁾, die man später auch in Hydrolysaten von Pyrromycin²⁾, Cinerubin A und B³⁾ sowie von γ -Rhodomycinen³⁾ aufgefunden hat. Nachdem unlängst die Konstitution und Konfiguration des Rhodosamins aufgeklärt worden ist⁴⁾, berichten wir im folgenden ausführlicher über unsere bisher nur kurz mitgeteilten Befunde.

Ausgangsmaterial für die Isolierung des Rhodosamins waren Rhodomycingemische aus Mycel und Kulturlösung von *Streptomyces purpurascens*, die als Hauptbestandteil Rhodomycin A enthielten. Sie wurden durch 8stdg. Hydrolyse mit 0.5*n* HCl bei 65° in Rhodomycinone und eine „wasserlösliche Abbaufraktion“ zerlegt, die aus Rhodosamin und stickstofffreien, Fehlingsche Lösung reduzierenden Verbindungen bestand. Aus dieser Fraktion konnten wir das Rhodosamin mit Reinecke-Salz als hellrotes, kristallisiertes Reineckat vom Schmp. 131–133° isolieren. Seine Analysenzahlen paßten leidlich auf $C_8H_{17}NO_3 \cdot C_4H_7CrN_6S_4$ und ergaben damit für Rhodosamin die Summenformel $C_8H_{17}NO_3$.

Der Gehalt des Rhodosaminsalzes an Reinecke-Säure wurde durch Umsetzen mit Silbersulfat und Wägung des bei 105° getrockneten Silbersalzes der Reinecke-Säure bestimmt. Da Kontrollversuche mit dem Pikrocinsalz der Reinecke-Säure um 12% zu hohe Werte ergaben, wurden die für das Rhodosaminsalz gefundenen entsprechend korrigiert.

Die Isolierung des Rhodosamins als kristallisiertes Hydrochlorid gelang, als die wasserlösliche Abbaufraktion an einer Säule des in der H^+ -Form vorliegenden Kationenaustauschers Dowex 50 unter Nachwaschen mit 2*n* HCl chromatographiert und das fraktioniert aufgefangene Filtrat laufend auf optische Aktivität geprüft wurde. Dabei liefen, gut voneinander getrennt, zwei optisch aktive Fraktionen ins Filtrat. Die schnellere, stickstofffreie Fraktion A enthielt reduzierende, in Wasser linksdrehende, nicht näher untersuchte Verbindungen. Die langsamer wandernde Fraktion B

1) H. BROCKMANN und E. SPOHLER, Naturwissenschaften **42**, 154 [1955].

2) H. BROCKMANN und W. LENK, Chem. Ber. **92**, 1904 [1959].

3) H. BROCKMANN und TH. WAEHNELDT, Naturwissenschaften **48**, 717 [1961].

4) H. BROCKMANN und TH. WAEHNELDT, Naturwissenschaften **50**, 92 [1963].

bestand aus Rhodosamin-hydrochlorid, das aus Aceton/Methanol in farblosen Nadeln vom Schmp. 152–153° (Zers.) kristallisierte. Es zeigt Mutarotation; als Anfangswert fanden wir in Wasser $[\alpha]_D^{20}$: $-65.2 \pm 0.4^\circ$, als Endwert $[\alpha]_D^{20}$: $-48.2 \pm 0.4^\circ$.

Die Analysenzahlen des Rhodosamin-hydrochlorides passen auf $C_8H_{17}NO_3 \cdot HCl$; in Übereinstimmung mit der Rhodosaminformel, die sich aus den Analysenzahlen des Rhodosaminsalzes der Reinecke-Säure ergibt. Acetylierung nach C. W. DE WALT und R. A. GLENN⁵⁾ zeigte, daß von den drei Sauerstoffatomen des Rhodosamins zwei als acetylierbare Hydroxyle vorliegen. Das dritte gehört zu einer in der Halb-acetalform vorliegenden Aldehydgruppe, denn Rhodosamin reduziert leicht Fehling'sche Lösung, ammoniakalische Silbernitratlösung und Triphenyl-tetrazoliumchlorid, wird bei der WILLSTÄTTER-SCHUDEL-Methode zur Bestimmung von Aldosen glatt oxydiert, zeigt aber im IR keine Carbonylbande.

Das Stickstoffatom des Rhodosamins ist Bestandteil einer Dimethylaminogruppe. Sie wird durch verd. wäßr. Alkalihydroxid leicht als Dimethylamin abgespalten, das wir als kristallisiertes Pikrat vom Schmp. 158–159° isoliert und durch Misch-Schmp. identifiziert haben.

KUHN-ROTH-Oxydation des Rhodosamins gab 0.9 Mol Essigsäure. Die dadurch nachgewiesene C-Methylgruppe steht an einem mit Sauerstoff verknüpften C-Atom, denn Rhodosamin liefert bei Hypojodit-Oxydation Jodoform.

Rhodosamin ist isomer mit Pikrocin⁶⁾ (Desosamin⁷⁾), das ebenfalls zwei acetylierbare Hydroxyle und eine durch wäßr. Alkalihydroxid leicht als Dimethylamin abspaltbare Dimethylaminogruppe enthält. Die beiden Isomeren unterscheiden sich durch ihre spezif. Drehung [Pikrocin-hydrochlorid, $[\alpha]_D^{20}$: $+50^\circ$ (Wasser); Rhodosamin-hydrochlorid, $[\alpha]_D^{20}$: -48° (Wasser)] und durch ihr Verhalten gegen Perjodsäure. Bei Titration mit 0.05 *m* Perjodat verbrauchte Pikrocin innerhalb von 30 Min. 1 Mol, während Rhodosamin nicht merklich reagierte. Bei 0.2 molarer Konzentration des Oxydationsmittels dauerte die Umsetzung von 1 Mol Perjodat mit Pikrocin wenige Minuten, mit Rhodosamin dagegen 48 Stdn.; und als wir 12-proz. wäßr. Natriumperjodat einwirken ließen, bis zwei Mol davon verbraucht waren, konnten wir annähernd die Hälfte des eingesetzten Rhodosamin-hydrochlorides kristallisiert zurückgewinnen. Damit war gezeigt, daß Rhodosamin keine benachbarten Hydroxygruppen enthält und somit kein Stereoisomeres des Pikrocins ist. Die Reaktionslösung des zuletzt genannten Versuchs enthielt etwa 1 Mol Säure, dem R_F -Wert nach Ameisensäure, sowie nahezu 0.5 Mol Acetaldehyd, der als 2.4-Dinitrophenylhydrazon isoliert und durch Misch-Schmp. und IR-Spektrum identifiziert wurde. Seine Entstehung beweist, daß die C-Methylgruppe des Rhodosamins mit einem sekundären C-Atom verknüpft ist.

Aus diesen Befunden ergaben sich für Rhodosamin zunächst die Formeln I und II. Da die Dimethylaminogruppe der beiden 3-Desoxy-3-dimethylamino-zucker Pikrocin⁶⁾ und Mycaminose⁸⁾ durch wäßr. Alkalihydroxid relativ leicht als Dimethylamin abgespalten wird und das gleiche für Rhodosamin gilt, war I wahrscheinlicher; nicht

⁵⁾ Analytic. Chem. **24**, 1789 [1952].

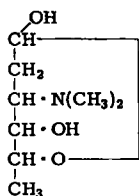
⁶⁾ H. BROCKMANN, H.-B. KÖNIG und R. OSTER, Chem. Ber. **87**, 856 [1954].

⁷⁾ R. K. CLARK JR., Antibiotics and Chemotherapy **3**, 663 [1953].

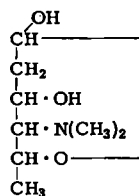
⁸⁾ F. A. HOCHSTEIN und P. P. REGNA, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3353 [1955].

aber bewiesen, denn auch bei II schien uns eine basenkatalysierte Eliminierung von Dimethylamin nicht ausgeschlossen.

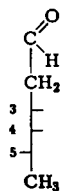
Den Beweis für I und zugleich für dessen Konfiguration an C-4 und C-5 konnten wir auf Grund folgender Überlegungen erbringen. Ließe sich die Dimethylaminogruppe des Rhodosamins ohne Änderung der Konfiguration durch eine Hydroxygruppe ersetzen, so würde, einerlei ob I oder II gilt, eine der acht stereoisomeren 2,6-Didesoxyhexosen entstehen; d. h., wenn Rhodosamin der L-Reihe angehörte: 2-Desoxy-L-fucose (III), L-Boivinose (IV), 2-Desoxy-L-rhamnose (V) oder L-Digitoxose (VI); und, wenn Rhodosamin zur D-Reihe gehörte: 2-Desoxy-D-fucose, D-Boivinose, 2-Desoxy-D-rhamnose oder D-Digitoxose. Bekannt wäre dann die Konfiguration des Rhodosamins an C-3, C-4 und C-5, nicht aber, ob die Dimethylaminogruppe an C-3 oder C-4 steht.



I

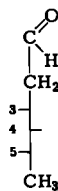


II



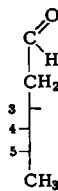
III

2-Desoxy-L-fucose



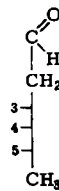
IV

L-Boivinose



V

2-Desoxy-L-rhamnose



VI

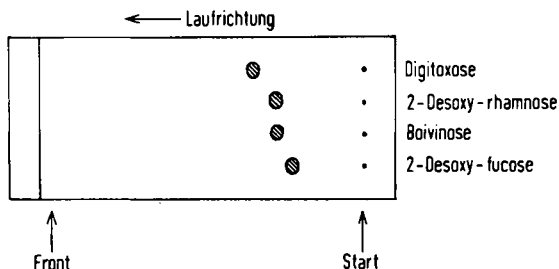
L-Digitoxose

Ließe sich die Dimethylaminogruppe dagegen nur unter Racemisierung des zugehörigen C-Atoms gegen Hydroxyl austauschen, dann würden aus einem Rhodosamin der Konstitution I und der L-Reihe, je nachdem, ob C-4 und C-5 die Konfiguration der Formeln III und IV oder V und VI haben, die Paare 2-Desoxy-L-fucose (III)/L-Boivinose (IV) oder 2-Desoxy-L-rhamnose (V)/L-Digitoxose (VI) entstehen; und dementsprechend aus einem D-Rhodosamin der Konstitution I die gleichen Paare der D-Reihe.

Hätte Rhodosamin dagegen die Konstitution II und gehörte es zur L-Reihe, so würde die unter Racemisierung verlaufende Substitution der Dimethylaminogruppe durch Hydroxyl entweder zum Paar 2-Desoxy-L-fucose (III)/2-Desoxy-L-rhamnose (V) oder zu L-Boivinose (IV)/L-Digitoxose (VI) führen, während ein D-Rhodosamin der Formel II die gleichen Paare der D-Reihe liefern müßte. Mit anderen Worten: Bei einem unter Racemisierung verlaufenden Austausch der Dimethylaminogruppe

gegen Hydroxyl müßten zwei 2.6-Didesoxy-hexosen entstehen, die 1) erkennen lassen, ob Rhodosamin Formel I oder II hat und die 2) zeigen, welche Konfiguration an C-4 und C-5 bzw. C-3 und C-5 von I bzw. II vorliegt.

Die experimentelle Prüfung dieser Überlegungen wurde dadurch erleichtert, daß sich, wie wir fanden, im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G, Chloroform/Aceton (1 : 1)) Digitoxose und 2-Desoxy-fucose voneinander sowie von Boivinose und 2-Desoxy-rhamnose trennen lassen. Digitoxose wandert am schnellsten, 2-Desoxy-fucose am langsamsten und Boivinose gleich schnell wie 2-Desoxy-rhamnose. Mit *o*-Aminophenol-phosphat färben sich ihre Zonen stahlblau.



Dünnschichtchromatogramme aller 2.6-Didesoxy-hexosen in Chloroform/Aceton (1 : 1) an Kieselgel G

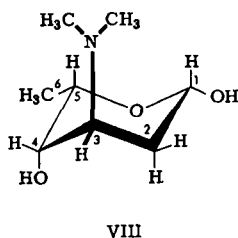
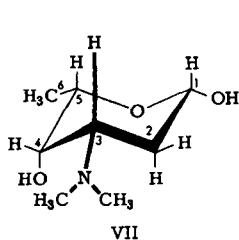
Da ein Ersatz der Dimethylaminogruppe des Rhodosamins durch Hydroxyl am ehesten unter sehr milden Bedingungen zu erwarten war, haben wir Rhodosamin 2–8 Stdn. mit 0.4-proz. wäBr. Bariumhydroxid auf 40–42° erwärmt und das Reaktionsgemisch auf der Kieselgel G-Dünnschichtplatte geprüft. Dabei zeigten sich zwei mit *o*-Aminophenol-phosphat blau werdende Zonen mit den gleichen R_F -Werten wie 2-Desoxy-fucose und Boivinose oder 2-Desoxy-rhamnose.

Um die beiden so nachgewiesenen Desoxyzucker in Substanz zu gewinnen, wurde 1 g Rhodosaminsulfat mit 0.4-proz. wäBr. Bariumhydroxid 2.5 Stdn. auf 42° erwärmt und das Reaktionsgemisch aus Chloroform/Aceton (1 : 1) an Kieselgel G unter Bedingungen chromatographiert, die zunächst einmal die Abtrennung der beiden Zucker von den anderen Reaktionsprodukten gestatteten. Das in etwa 10-proz. Ausbeute angefallene Gemisch der beiden Zucker lieferte bei erneuter Chromatographie an Kieselgel G im Durchlaufverfahren: 1) eine als erste ins Filtrat laufende Fraktion (A), deren Dünnschichtchromatogramm nur eine Zone, und zwar mit dem R_F -Wert der Boivinose oder 2-Desoxy-rhamnose zeigte, 2) eine Mittelfraktion, die auf der Kieselgel G-Platte zwei Flecke mit dem R_F -Wert der 2-Desoxy-fucose und Boivinose oder 2-Desoxy-rhamnose gab und 3) eine Fraktion (B), die dem Dünnschichtchromatogramm nach nur 2-Desoxy-fucose enthielt. Alle zeigten die für 2-Desoxy-zucker charakteristische KELLER-KILIANI-, WEBB- sowie Perjodat-Thiobarbitursäure-Reaktion. Keine konnte zur Kristallisation gebracht werden.

Fraktion A zeigte das gleiche IR-Spektrum wie ein authentisches D-Boivinose-Präparat und unterschied sich damit charakteristisch von 2-Desoxy-rhamnose. Da D-Boivinose in Aceton linksdrehend ($[\alpha]_D^{20}$: -15.2°) ist, Fraktion A dagegen nach rechts drehte, ($[\alpha]_D^{20}$: $+10.4^\circ$), war diese nunmehr als L-Boivinose identifiziert.

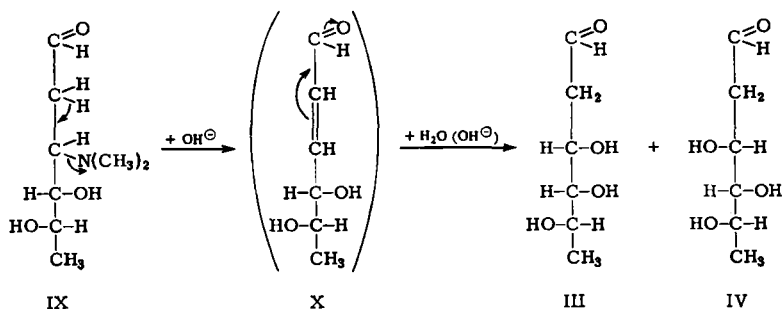
Fraktion B stimmte im IR-Spektrum mit authentischer 2-Desoxy-L-fucose ($[\alpha]_D^{20}$: -136° , in Aceton) überein und zeigte wie diese Linksdrehung ($[\alpha]_D^{20}$: -86.2° , in Aceton). Damit war sie als 2-Desoxy-L-fucose erkannt. Da wir darauf verzichteten, unsere sirupösen Fraktionen A und B wasserfrei zu machen, ist verständlich, daß ihre $[\alpha]_D^{20}$ -Werte niedriger lagen als die der kristallisierten, authentischen Vergleichspräparate.

Wie die Formeln III–VI zeigten, kann Rhodosamin beim Austausch seiner Dimethylaminogruppe gegen Hydroxyl nur dann zu 2-Desoxy-L-fucose (III) und L-Boivinose (IV) werden, wenn 1) die Dimethylaminogruppe wie in I an C-3 steht und 2) die Konfiguration an C-4 und C-5 die gleiche ist wie in III und IV; oder anders gesagt, wenn Rhodosamin entweder Formel VII oder VIII (Beide Formeln sind die des β -Anomeren) hat und somit der L-Reihe angehört.



Rhodosamin zeigt nicht die für 2-Desoxy-zucker charakteristische KELLER-KILIANI-Reaktion. Dagegen konnten wir seine 2-Desoxygruppe durch die Perjodat-Thiobarbitursäure-Reaktion⁹⁾ nachweisen. Dabei entsteht aus dem C-1, C-2 und C-3 enthaltenden Teil des Rhodosamin-Moleküls Malondialdehyd, der mit Thiobarbitursäure einen roten Farbstoff mit λ_{\max} 532 m μ (Wasser) gibt.

Auf welchem Wege Rhodosamin durch Bariumhydroxid in III und IV übergeht, bleibt offen. Da die für 3-Desoxy-3-dimethylamino-zucker charakteristische, leichte Abspaltung von Dimethylamin durch Alkalihydroxid bei der Mycaminose ausbleibt, wenn sie als Methylglykosid vorliegt⁸⁾, entsteht das Dimethylamin offenbar aus der Aldehydform und dann wohl kaum anders als durch eine basenkatalysierte β -Eliminierung¹⁰⁾. Aus Rhodosamin würde dabei zunächst X entstehen. Nimmt man an, daß sich an dieses unter der Einwirkung



⁹⁾ V. S. WARAVDECAR und L. D. SASLAW, J. biol. Chemistry **234**, 1945 [1959].

¹⁰⁾ C. H. BOLTON, A. B. FOSTER, M. STACEY und I. M. WEBBER, J. chem. Soc. [London] **1961**, 4831.

des verd. Bariumhydroxides — analog der Reaktion Acrolein \rightarrow β -Hydroxy-propionaldehyd oder analog der basenkatalysierten Bildung von β -Methoxy-butyrinaldehyd aus Crotonaldehyd und Methanol — Wasser anlagern kann, so wäre die Entstehung von III und IV erklärt und, da X sicher noch in anderer Richtung reagieren kann, verständlich, daß die Ausbeute an III und IV nur mäßig ist.

Im Gegensatz zum Rhodosamin haben die anderen bisher bekannten 3-Desoxy-3-dimethylamino-zucker Pikrocin (Desosamin), Mycosamin und Amosamin¹¹⁾ an C-2 eine Hydroxygruppe. Bei ihnen führt daher β -Eliminierung von Dimethylamin zu einem Enol und damit zu einem Ketoaldehyd¹⁰⁾. Ersatz von Dimethylamin durch Hydroxyl ist bei ihnen demnach nicht zu erwarten. Wie wir fanden, wird Dimethylamin aus Rhodosamin noch leichter eliminiert als aus Pikrocin (Desosamin); vielleicht deswegen, weil Rhodosamin an C-2 keine Hydroxygruppe hat.

Aufklärung über die Konfiguration an C-3 des Rhodosamins und damit die Entscheidung zwischen VII und VIII brachte das NMR-Spektrum. Um die störenden Protonen der beiden Hydroxygruppen an C-1 und C-4 zu beseitigen, haben wir Rhodosamin mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert und das Reaktionsprodukt aus Chloroform/Aceton (1 : 1) an Kieselgel G chromatographiert. Dabei erhielten wir zwei kristallisierte, isomere Verbindungen, die sich durch ihre auf $C_{12}H_{21}NO_5$ passenden Analysenzahlen als die beiden anomeren Rhodosamin-diacetate zu erkennen gaben. Das im Chromatogramm schneller wandernde Diacetat A schmolz bei 68–73° und zeigte in Aceton $[\alpha]_D^{20}$: $-20 \pm 1^\circ$. Für das langsamer wandernde, bei 81–83° schmelzende Anomere (Diacetat B) fanden wir in Aceton $[\alpha]_D^{20}$: $-109 \pm 3^\circ$. Beide unterscheiden sich charakteristisch in ihrem IR-Spektrum.

Die NMR-Spektren der beiden Diacetate wurden mit einem Varian A 60-Spektrometer in Deuteriochloroform mit Tetramethylsilan als internem Standard aufgenommen.

Tab. 1. NMR-Spektren der anomeren Rhodosamin-diacetate
 τ -Werte

	C—CH ₃	N(CH ₃) ₂	O—Ac	O—Ac			
Diacetat A	8.82	7.72	7.87	7.85			
Diacetat B	8.88	7.71	7.92	7.86			
Proton an:							
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5		
Diacetat A	4.23	8.3—7.9	7.57	4.79	6.24		
Diacetat B	3.67	8.2—7.9	7.35	4.69	5.94		
Kopplungskonstanten (in Hz)							
	<i>J</i> _{1,2e}	<i>J</i> _{1,2a}	<i>J</i> _{2a,3}	<i>J</i> _{2e,3}	<i>J</i> _{3,4}	<i>J</i> _{4,5}	<i>J</i> _{5,6}
Diacetat A	4.0	8.0	12.0	5.0	2.0	2.0	6.5
Diacetat B	2.3	2.3	10.5	6.0	2.0	2.0	6.5

Bei $\tau = 7.72$ (Diacetat A) und $\tau = 7.71$ (Diacetat B) liegen die Signale der Dimethylamino-gruppe, deren Integration sechs Protonen ergibt. Die beiden Acetoxygruppen geben sich durch $\tau = 7.87$ und $\tau = 7.85$ (Diacetat A) und $\tau = 7.92$ und 7.86 (Diacetat B) zu erkennen; ihre gemeinsame Integration ergibt $2 \times 3 = 6$ Protonen. Bei höchsten Feldstärken $\tau = 8.82$ (Diacetat A) und $\tau = 8.88$ (Diacetat B) liegen die Signale der terminalen Methylgruppe, die

¹¹⁾ C. L. STEVENS, R. J. GASER, T. K. MUKHERJEE und T. H. HASKELL, J. Amer. chem. Soc. 78, 6212 [1956].

durch Kopplung mit dem Proton an C-5 zu Dubletts aufgespalten sind ($J_{5,6} = 6.5$ Hz) (3 H bei Integration).

Aus den τ -Werten ist ersichtlich, daß die Signale der Ringprotonen weit voneinander entfernt und die Konstanten der wechselseitigen Spin-Kopplung daher ohne Schwierigkeiten bestimmbar sind.

Allgemein findet man für die Spin-Kopplung zweier benachbarter Protonen in axial-axial-Position Kopplungskonstanten von 8–13 Hz, während für benachbarte Protonen in äquatorial-axial- und äquatorial-äquatorial-Position Kopplungskonstanten unter 7 Hz beobachtet werden¹²⁾.

Am Signal des Protons an C-4 ($\tau = 4.79$ (Diacetat A) und $\tau = 4.69$ (Diacetat B)) sind nur Kopplungskonstanten = 2 Hz zu beobachten. Folglich kann die große Konstante des Protons an C-3 (12 Hz (Diacetat A) und 10.5 Hz (Diacetat B)) nur von einer axial-axial-Kopplung der Protonen an C-2 und C-3 herrühren. Die gleichen Konstanten müssen auch in den Signalen der Methylenprotonen auftreten. Sie lassen sich jedoch nicht vollständig erkennen, da sie teilweise von den breiten Absorptionen der Acetoxygruppen verdeckt sind. Damit ist bewiesen, daß in beiden Acetaten (Diacetat A und Diacetat B) das Proton an C-3 axial und die Dimethylaminogruppe äquatorial angeordnet ist.

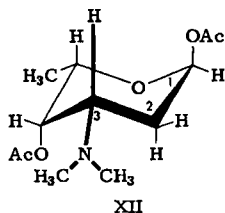
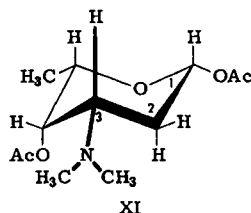
Die Analyse des Protonensignals von C-1 zeigt, daß die beiden Acetate Anomere sind:

Ein symmetrisches Triplett im Spektrum von Diacetat B ($\tau = 3.67$) kann durch die benachbarten Methylenprotonen nur dann hervorgerufen werden, wenn diese gleich weit vom Proton an C-1 entfernt sind. Das ist aber nur dann der Fall, wenn der Wasserstoff an C-1 äquatorial, die Acetoxygruppe an C-1 aber axial steht. Diacetat B ist demnach das α -Anomere. In Übereinstimmung damit zeigt es die für α -Anomere der L-Reihe charakteristische größere Linksdrehung.

Diacetat A hat ein komplexes Signal ($\tau = 4.23$) mit zwei verschiedenen großen Kopplungskonstanten (4 Hz und 8 Hz). Das ist nur verständlich, wenn das Proton an C-1 axial, die zugehörige Acetoxygruppe aber äquatorial steht. Folglich ist Diacetat A das β -Anomere, wofür auch die gegenüber Diacetat B kleinere Linksdrehung (-20°) spricht.

Daß die τ -Werte der C-1-Protonen der beiden Anomeren verschieden sind, stimmt mit Beobachtungen von J. N. SHOOLEREY und M. T. ROGERS¹³⁾ überein, nach denen ein äquatoriales Proton bei kleineren τ -Werten als ein entsprechendes axiales absorbiert.

Faßt man alle Befunde zusammen, so ergibt sich für Diacetat A Formel XI und für Diacetat B Formel XII.

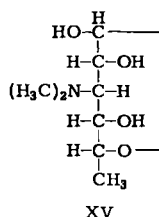
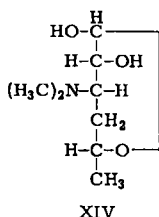
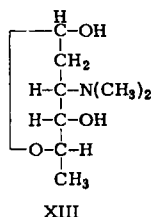


Danach ist Rhodosamin die 2.3.6-Tridesoxy-3-dimethylamino-L-*lyxo*-hexose und hat als β -Anomeres die Formel VII. Formeln XIII–XV zeigen die konstitutiven und

¹²⁾ H. CONROY, *Advances in Organic Chemistry*, Band 2, S. 308ff., Interscience, New York 1960.

¹³⁾ J. Amer. chem. Soc. **80**, 5121 [1958].

konfigurativen Unterschiede zwischen Rhodosamin (XIII), Pikrocin (Desosamin) (XIV)¹⁴⁾ und Mycosamin (XV)¹⁵⁾.



Dem FONDS DER CHEMIE danken wir für Förderung unserer Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE*)

Wasserlösliche Abbaufraktion aus „Rhodomycingemisch“: Ausgangsmaterial war ein Gemisch aus Pikraten von Rhodomycinen und Iso-rhodomycinen, das, wie früher beschrieben, aus Mycel¹⁶⁾ und Kulturlösung¹⁷⁾ von *Str. purpurascens* gewonnen worden war. Zu einer Lösung von 9.8 g dieses Gemisches in 240 ccm Aceton gab man 240 ccm 0.1 *n* HCl, schüttelte die Pikrinsäure erschöpfend mit Äther aus, brachte die wäßr. Phase mit Natriumcarbonat auf pH 8.5 und extrahierte sie mit Chloroform/Äthanol (4 : 1). Der tiefrote Auszug hinterließ, i. Vak. verdampft, 4.5 g eines Gemisches aus Rhodomycinen und Iso-rhodomycinen („Rhodomycingemisch“).

Eine Lösung von 4.3 g „Rhodomycingemisch“ in 240 ccm 0.5 *n* HCl erwärmte man 8 Stdn. auf 65°, filtrierte die ausgefallenen Rhodomycinone und Iso-rhodomycinone (2.4 g) ab und brachte das Filtrat mit Amberlite 1R-4B (Carbonatform) auf pH 3.0. Die mit Aktivkohle entfärbte Lösung hinterließ, i. Vak. verdampft, die wasserlösliche Abbaufraktion als gelblichen Sirup.

Rhodosaminsalz der Reinecke-Säure: Eine Lösung von 170 mg wasserlös. Abbaufraktion in 5 ccm Wasser brachte man mit 10-proz. Essigsäure auf pH 4.5 und versetzte sie mit dem gleichen Vol. einer kalt gesättigten Lösung von Reinecke-Salz. Als nach Abfiltrieren eines hellbraunen Niederschlages (24 mg) die Lösung bei 40° i. Vak. auf die Hälfte eingengt wurde, fiel das Rhodosaminsalz der Reinecke-Säure als hellroter, kristalliner Niederschlag aus. Man löste ihn in 4 ccm Aceton, verdünnte mit dem gleichen Vol. Wasser und engte bei 35–40° auf 5 ccm ein. Das in langen Nadeln auskristallisierende Salz vom Schmp. 131–133° war in Aceton leicht, in kaltem Wasser mäßig löslich.

$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_7\text{CrN}_6\text{S}_4$ (494.6) Ber. C 29.14 H 4.89 N 19.83 Cr 10.51
Gef. *) C 29.09 H 5.03 N 19.16 Cr 10.59

*) Getrocknet 6 Stdn. i. Hochvak. bei 105°.

Zerlegung des Rhodosaminsalzes der Reinecke-Säure: Zu einer Lösung von 53.0 mg des Rhodosaminsalzes in 10 ccm Aceton/Wasser (1 : 1) gab man 8.5 ccm einer Lösung, die 5.112 g Silbersulfat im Liter enthielt, saugte das ausgefallene Silbersalz der Reinecke-Säure ab, wusch mit

*) Alle Schmpp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert.

14) W. HOFHEINZ und H. GRIEBACH, Tetrahedron Letters [London] 1962, 377.

15) W. HOFHEINZ und H. GRIEBACH, Z. Naturforsch. 17b, 355 [1962]; A. C. RICHARDSON, Proc. chem. Soc. [London] 1961, 430.

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

17) H. BROCKMANN und B. FRANCK, Chem. Ber. 88, 1792 [1955].

wenig Aceton/Wasser nach und trocknete 4 Stdn. i. Hochvak. bei 105°. $\text{Ag} \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{CrN}_6\text{S}_4$ Ber. 45.6 mg, Gef. 52.1 mg (14% zu hoch).

Zur Kontrolle wurden in gleicher Weise umgesetzt: a) 11.5 mg Pikrocinsalz der Reinecke-Säure. $\text{Ag} \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{CrN}_6\text{S}_4$ Ber. 9.9 mg, Gef. 11.0 mg (12% zu hoch), b) 2 ccm der Silbersulfatlösung (enthaltend 10.225 mg/ccm). $\text{Ag} \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{CrN}_6\text{S}_4$ Ber. 28.0 mg, Gef. 32.1 mg (15% zu hoch).

Chromatographie der wasserlöslichen Abbaufraktion: Eine Lösung von 2 g der wasserlöslichen Abbaufraktion in 5 ccm Wasser gab man auf eine Säule (1.3 × 33 cm) aus Dowex 50 (200–400 mesh; nach Vorbehandeln mit 2*n* NaOH und dest. Wasser 24 Stdn. mit 2*n* HCl gewaschen), ließ anschließend 6 ccm Wasser in die Säule und eluierte mit 2*n* HCl (Durchlauf 1 ccm/Min.). Das Eluat wurde in 5-ccm-Anteilen aufgefangen und auf optische Aktivität untersucht.

Die optisch aktiven Eluate Nr. 3–6 vereinigte man zur Fraktion A, die optisch aktiven Eluate Nr. 11–19 zur Fraktion B, stellte in beiden mit Amberlite IR-4B auf pH 5.4 ein, entfärbte mit Aktivkohle, verdampfte i. Vak. und trocknete den sirupösen Rückstand i. Vak. über Kaliumhydroxid bis zur Gewichtskonstanz.

Fraktion A. Ausb. 0.35 g. $[\alpha]_D^{20}$: –39.0° (*c* = 1.72, in Wasser). Gef. N 0.30, Cl 0.83. Im Papierchromatogramm (Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5), ansteigende mobile Phase) bildeten sich eine Hauptzone R_F = 0.57 und zwei unscharfe Zonen mit größerem R_F -Wert, die alle mit Triphenyl-tetrazolium-chlorid rot wurden.

Rhodosamin-hydrochlorid: Fraktion B (1.4 g) löste man in 2 ccm absol. Methanol und versetzte tropfenweise mit 3 ccm Aceton, worauf das Rhodosamin-hydrochlorid in farblosen, rechteckigen Blättchen auskristallisierte. Zugabe von 3 ccm Aceton und 8 stdg. Aufbewahren bei 4° vervollständigte die Ausscheidung. Ausb. 1.01 g. Nach Umkristallisieren aus absol. Äthanol lag der Schmp. bei 152–153°. $[\alpha]_D^{20}$: –48.2° (nach 25 Min., Anfangswert –65.2°; *c* = 2.94, in Wasser).

$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ (211.7) Ber. C 45.39 H 8.57 N 6.62 Cl 16.75 1 *N*-CH₃ 7.11 1 *C*-CH₃ 7.1
Gef. C 45.70 H 8.99 N 6.53 Cl 16.20 *N*-CH₃ 10.98 *C*-CH₃ 8.0

Hydroxylbestimmung: 38.4 mg Rhodosamin-hydrochlorid erwärmte man mit 1 ccm Acetylierungsgemisch (Acetanhydrid/Pyridin (5 : 12); abgemessene Menge durch Wägung kontrolliert) 15 Min. auf 115°, verdünnte mit 35 ccm Wasser und titrierte mit 0.5*n* NaOH gegen Phenolphthalein. Differenz gegenüber Blindprobe: 0.78 ccm 0.5*n* NaOH. OH Ber. 2.0, Gef. 2.1. Kontrollversuch mit 50.9 mg Pikrocin-hydrochlorid. Differenz gegenüber Blindprobe: 0.98 ccm 0.5*n* NaOH. OH Ber. 2.0, Gef. 1.9.

Abspaltung von Dimethylamin: Aus einer Lösung von 200 mg Rhodosamin-hydrochlorid in 70 ccm 2*n* NaOH destillierte man 30 ccm in eine mit 10 ccm 0.1*n* HCl beschickte Vorlage, verdampfte den Inhalt der Vorlage, nahm den Rückstand in 1 ccm Wasser auf und versetzte mit gesättigter Pikrinsäurelösung. Das ausgefallene Pikrat schmolz nach Umkristallisieren aus Äthanol bei 158–159° und zeigte im Gemisch mit Dimethylamin-pikrat keine Schmp.-Erniedrigung.

Zu je 10 mg Rhodosamin-hydrochlorid, Pikrocin-hydrochlorid und Glucosamin-hydrochlorid gab man in kleinen Schalen 1 ccm 4*n* NaOH und bedeckte sie mit Uhrgläsern, deren Unterseite einen Streifen feuchten Indikatorpapiers (E. Merck) trug. Beim Rhodosamin und Pikrocin zeigte das Indikatorpapier innerhalb von 10 Min. die für pH 8–9 charakteristische Färbung, beim Glucosamin erst nach 90 Min.

Jodoformprobe: Zu einer Lösung von 22 mg Rhodosamin-hydrochlorid in 0.2 ccm Wasser gab man 0.6 ccm Jodlösung (2 g KJ und 1 g J₂ in 8 ccm Wasser) und dann tropfenweise 20-proz. wässr. Natriumhydroxid, bis die Farbe nur noch schwach gelb war. Nach einiger Zeit

wurde 10 Min. auf 40° erwärmt, wobei man durch Zugabe von Jodlösung die Farbe hellgelb hielt. Der kristalline, hellgelbe Niederschlag gab mit Jodoform keine Schmp.-Erniedrigung (119°).

Abbau des Rhodosamins zu Acetaldehyd: Eine Lösung von 46 mg Rhodosamin-hydrochlorid in 4 ccm 12-proz. NaJO₄-Lösung, die 18 Stdn. bei 20° unter Lichtausschluß gehalten worden war, verdünnte man mit 25 ccm Wasser und destillierte bei 60° Badtemperatur einen kleinen Teil des Wassers in eine gesättigte Lösung von 2.4-Dinitrophenylhydrazin in 2*n* HCl. Der nach wenigen Min. ausgefallene Niederschlag (25 mg) bildete im Ringchromatogramm (Formamid/Petroläther) eine scharf abgegrenzte Zone, die zwischen der des Formaldehyd- und Propionaldehyd-2.4-dinitrophenylhydrazons lag. Umkristallisieren aus Äthanol gab gelbe Nadeln vom Schmp. 163–165° (Kofler-Block, kor.), die im Gemisch mit Acetaldehyd-2.4-dinitrophenylhydrazon (Schmp. 163–165°) keine Schmp.-Erniedrigung zeigten. Beide Präparate hatten das gleiche IR-Spektrum.

Oxydation des Rhodosamins mit Natriumperjodat: Zu einer Lösung von 295 mg Rhodosamin-hydrochlorid in 25 ccm 12-proz. NaJO₄-Lösung, die 90 Min. bei 20° gehalten worden war, gab man konz. Bleinitratlösung, bis nichts mehr ausfiel, und verdampfte die abzentrifugierte Lösung i. Vak. Digerieren des Rückstandes mit absol. Äthanol und Verdampfen des Äthanol-auszuges lieferte einen sirupösen Rückstand (220 mg) mit $[\alpha]_D^{20}$: –44.7° (*c* = 0.25, in Wasser).

Die wäßr. Lösung des Rückstandes chromatographierte man, wie oben beschrieben, an Dowex 50, eluierte mit 1.3*n* HCl, fing die Eluate in 5-ccm-Fractionen auf, vereinigte die optisch aktiven, stellte mit Amberlite IR-4 B auf pH 5.4 ein und verdampfte i. Vak. Der Rückstand kristallisierte aus Methanol/Aceton (3:1) in Blättchen, die bei 140–147° schmolzen und im IR-Spektrum praktisch mit Rhodosamin-hydrochlorid übereinstimmten. Ausb. 160 mg.

Perjodsäure-Titrationen. a) 0.04 *m* Perjodsäure: Einer Lösung von 49.5 mg Rhodosamin-hydrochlorid bzw. 36.3 mg Threonin in 15 ccm Perjodsäure (10 mg H₅JO₆/ccm) entnahm man zu verschiedenen Zeiten jeweils 2 ccm, versetzte mit 3 ccm 2*n* H₂SO₄ sowie 5 ccm 5-proz. Kaliumjodidlösung und titrierte mit 0.1 *n* Natriumthiosulfat. Die Tabelle zeigt den Verbrauch an Thiosulfat in ccm und den an H₅JO₆ in Mol/Mol Substanz.

Zeit (Std.)	0.5	1.5	3	24
Blindprobe	6.95	6.96	6.97	6.82
Rhodosamin	6.93	6.95	6.93	6.82
Threonin	6.70	6.36	6.07	5.50
H ₅ JO ₆ -Verbrauch	0.31	0.74	1.1	1.6

b) 0.2 *m* Perjodsäure: Einer Lösung von 74.5 mg Rhodosamin-hydrochlorid bzw. 75.6 mg Pikrocin-hydrochlorid in 7 ccm Perjodsäure (46.4 bzw. 46.25 mg H₅JO₆/ccm) wurden jeweils 2 ccm entnommen, mit 3 ccm 2*n* H₂SO₄ und 10 ccm 20-proz. Kaliumjodidlösung versetzt und mit 0.1 *n* Thiosulfat titriert.

Zeit (Std.)	1.25	18.25	48
H ₅ JO ₆ -Verbrauch in Mol pro Mol Rhodosamin	0.2	0.6	1.1
Zeit (Std.)	0.5	2	20
H ₅ JO ₆ -Verbrauch in Mol pro Mol Pikrocin	1.1	1.1	1.3

c) *12-proz. Natriumperjodatlösung*: Einer Lösung von 81.8 mg Rhodosamin-hydrochlorid bzw. 87.2 mg Rhamnose in 7 ccm 12-proz. Natriumperjodatlösung wurden jeweils 2 ccm entnommen, mit 10 ccm Wasser verdünnt und nach Zugabe von 200 mg Natriumhydrogencarbonat mit 25 ccm 0.1 *n* Natriumarsenit (20 g NaHCO_3 im Liter enthaltend) sowie 1 ccm 20-proz. Kaliumjodidlösung versetzt. Nach 12 Min. wurde das überschüssige Arsenit mit 0.1 *n* Jod zurücktitriert.

Zeit (Stdn.)	1	3	23
NaJO ₄ -Verbrauch in Mol pro Mol Rhodosamin	0.9	1.3	2.5
NaJO ₄ -Verbrauch in Mol pro Mol Rhamnose	4.1	4.1	

d) *Bestimmung der bei der Perjodat-Oxydation entstandenen Säure*: Einer Lösung von 79.0 mg Rhodosamin-hydrochlorid in 7 ccm 12-proz. Natriumperjodatlösung entnahm man jeweils 2 ccm, verdünnte mit 5 ccm Wasser und titrierte nach Zugabe von 2 Tropfen Methylrotlösung mit 0.1 *n* NaOH.

Zeit (Stdn.)	1	3	22
Säurebildung in Mol pro Mol Rhodosamin	0.05	0.19	0.84

Die nach 22 Stdn. titrierte Probe wurde mit Ammoniak auf pH 8.9 gebracht und im Papierchromatogramm (mobile Phase: 100 ccm 95-proz. Äthanol + 1 ccm konz. Ammoniak) mit Ameisensäure, Essigsäure und Propionsäure verglichen. Nach 4–5 stdg. Laufzeit trocknete man 5 Min. bei 100° und besprühte mit einer Lösung von Bromthymolblau (50 mg Bromthymolblau, 200 mg Citronensäure in 100 ccm Wasser; Säuren erscheinen blau auf gelbem Untergrund). Die Perjodatlösung (JO_4^- bleibt am Startkreis) zeigte eine Zone mit dem R_F -Wert der Ameisensäure. Ebenso wie Ameisensäure konnte man diese Zone auch durch ammoniakalische Silbernitratlösung sichtbar machen (Braunfärbung nach Besprühen mit 0.1 *n* $\text{AgNO}_3/5n \text{ NH}_3$ und Trocknen bei 105°).

Änderung der spezif. Drehung bei der Perjodat-Oxydation. α -Werte einer Lösung von 81.7 mg Rhodosamin-hydrochlorid und 840 mg Natriumperjodat in 7 ccm Wasser:

Zeit (Stdn.)	0.08	0.2	3	20	72
α	−0.56	−0.55	−0.42	−0.33	−0.18

Überführung von Rhodosamin in 2-Desoxy-L-fucose und L-Boivinose: Eine Lösung von 1.04 g Rhodosamin-sulfat in 200 ccm 0.4-proz. wäßr. Bariumhydroxid (pH 12.2) wurde 2.5 Stdn. auf 42° erwärmt, nach Abkühlen mit verd. Schwefelsäure auf pH 5.0 eingestellt und nach Abzentrifugieren des Bariumsulfates i. Vak. bei 35° verdampft. Den viskosen, bräunlichen Rückstand (880 mg) chromatographierte man aus Chloroform/Aceton (1 : 1) an einer Säule (42 × 2 cm) aus Kieselgel G und fing das Eluat im Fraktionssammler (40 Min.-Wechsel) auf. Die Fraktionen 52–132 zeigten im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G, Chloroform/Aceton) nach Besprühen mit *o*-Aminophenol (1-proz. methanolische Lösung von *o*-Aminophenol mit 10 ccm Phosphorsäure und 5 ccm Wasser versetzt) und 10 Min. langem Erhitzen auf 110–120° zwei stahlblaue Flecke mit dem R_F -Wert der Boivinose bzw. 2-Desoxy-fucose.

Die 80 Fraktionen vereinigte man, verdampfte i. Vak. und chromatographierte den Rückstand (153 mg) erneut aus Chloroform/Aceton an einer Säule (50 × 2 cm) aus Kieselgel G, wobei das Eluat wiederum im 40-Min.-Wechsel aufgefangen und wie beschrieben auf der Dünnschichtplatte geprüft wurde.

Fraktionen 108—127 zeigten einen Fleck mit dem R_F -Wert der Boivinose und hinterließen nach Verdampfen i. Vak. 29 mg eines farblosen Sirups mit $[\alpha]_D^{20}$: $+10.4 \pm 0.9^\circ$ ($c = 0.96$, in Aceton).

Fraktionen 128—160 zeigten zwei Flecke mit dem R_F -Wert der Boivinose bzw. 2-Desoxy-fucose und hinterließen beim Verdampfen i. Vak. 68 mg Rückstand mit $[\alpha]_D^{20}$: $-49 \pm 1.2^\circ$ ($c = 2.26$, in Aceton).

Fraktionen 161—197 zeigten einen Fleck mit dem R_F -Wert der 2-Desoxy-fucose und hinterließen, i. Vak. verdampft, 32 mg Rückstand mit $[\alpha]_D^{20}$: $-86 \pm 2.1^\circ$ ($c = 1.07$, in Aceton).

Verhalten von 2-Desoxy-L-fucose und L-Boivinose gegen wäßr. Bariumhydroxid: Man löste von 2-Desoxy-L-fucose und L-Boivinose jeweils einige mg in 2 ccm Aceton, hielt die Hälfte als „Vergleichslösung“ zurück, verdampfte die andere Hälfte i. Vak. und erwärmte den Rückstand mit wäßr. Bariumhydroxid 2.5 Stdn. auf 42° . Nachdem mit verd. Schwefelsäure auf pH 5.0 eingestellt und das Bariumsulfat abzentrifugiert worden war, verdampfte man i. Vak. und nahm den Rückstand in 1 ccm Aceton auf. Von dieser Lösung und der „Vergleichslösung“ chromatographierte man gleiche Vol. auf einer Kieselgel G-Dünnschichtplatte (Chloroform/Aceton (1 : 1), *o*-Aminophenol-phosphat). Bei den mit Bariumhydroxid behandelten Zuckern wurde nur ein Fleck beobachtet, der im R_F -Wert mit dem Ausgangsmaterial übereinstimmte, in der Intensität jedoch erheblich geringer war.

Acetylierung des Rhodosamins: Eine Lösung von 620 mg Rhodosamin-sulfat in 20 ccm Wasser brachte man mit 4-proz. wäßr. Bariumhydroxid auf pH 9.2, zentrifugierte das Bariumsulfat ab und verdampfte i. Vak. Den hellbraunen, viskosen Rückstand löste man unter Erwärmen in 4 ccm Acetanhydrid/Pyridin (1 : 1), hielt die Lösung 16 Stdn. bei 20° , verdampfte das Acetylierungsgemisch i. Vak. und chromatographierte den sirupösen, braunen Rückstand aus Chloroform/Aceton (1 : 1) an einer Säule (55×1.8 cm) aus Kieselgel G.

Dünnschichtchromatographische Kontrolle des in 5-ccm-Anteilen aufgefangenen Eluates an Kieselgel G [Chloroform/Aceton (1 : 1), Zonen durch Besprühen mit 3.8-proz. methanolischer Schwefelsäure und Erhitzen auf 160 – 170° als braune, violett fluoreszierende Flecken sichtbar gemacht] zeigte, daß zwei Fraktionen eluiert wurden. Nachdem das Lösungsmittel i. Hochvak. verdampft war, hinterblieben sie als hellbraune Öle, die nach einiger Zeit vollständig durchkristallisierten. Fraktion A (die schneller wandernde): 156 mg. Fraktion B: 124 mg.

β -Rhodosamin-diacetat aus Fraktion A schmolz bei 68 – 73° ; $[\alpha]_D^{20}$: $-20 \pm 1^\circ$ ($c = 2.87$, in Aceton).

$C_{12}H_{21}NO_5$ (259.3) Ber. C 55.58 H 8.16 N 5.40 Gef. C 56.19 H 7.83 N 5.38

α -Rhodosamin-diucetat aus Fraktion B schmolz bei 81 – 83° ; $[\alpha]_D^{20}$: $-109 \pm 3^\circ$ ($c = 0.18$, in Aceton).

$C_{12}H_{21}NO_5$ (259.3) Ber. C 55.58 H 8.16 N 5.40 Gef. C 56.41 H 8.15 N 5.34