

KLAUS ECKARDT

Rote Antibiotica aus Actinomyceten

Partialstruktur von Griseorhodin A

Aus dem Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie Jena
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

(Eingegangen am 13. Juni 1964)

Das aus dem *Streptomyces*-Stamm JA 2640 als Hauptfarbstoff isolierte Antibioticum Griseorhodin A gab durch Einwirkung von methanolischer Salzsäure ein kristallines, rotes Abbauprodukt. Die analytischen Ergebnisse dieser Verbindung, die sich vom 2.5.8-Trihydroxy-naphthochinon-(1.4) (Naphthopurpurin) ableitet, wurden in einer Partialformel zusammengefaßt, die nach vergleichenden Untersuchungen auch im Molekül des Griseorhodin A enthalten ist.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Actinomycetenfarbstoffe wurde vor einiger Zeit aus einem *Streptomyces*-Stamm JA 2640, der innerhalb der Serie „*Griseus*“ zur Art *Streptomyces californicus* *) eingeordnet wurde, ein rotes Antibioticum isoliert¹⁾. Dieses Antibioticum erwies sich als ein Gemisch mehrerer antibakteriell wirksamer Farbstoffe. Die einzelnen Komponenten ließen sich anhand ihrer allgemeinen Reaktionen eindeutig von den bisher näher charakterisierten Actinomycetenfarbstoffen differenzieren und wurden deshalb als Griseorhodine bezeichnet²⁾.

Die Griseorhodine wurden durch wiederholte Mycelextraktion mit Aceton gewonnen, wobei unterschiedlich gefärbte Substanzfraktionen anfielen, die zum Teil größere Mengen brauner, biologisch inaktiver Verunreinigungen enthielten.

Papierchromatographisch wurden mit den Systemen formamidgesättigtes Benzol, Chloroform und Propanol/Wasser (7 : 3) fünf Einzelkomponenten, die Griseorhodine A, B, C, K und L, nachgewiesen. Aus dem Rohgemisch ließ sich der Hauptfarbstoff Griseorhodin A am besten durch Extraktion mit Dioxan isolieren. Trotz papierchromatographischer Einheitlichkeit konnte der gereinigte Farbstoff nicht kristallisiert werden³⁾.

Griseorhodin A löst sich mit charakteristischer, tiefroter Farbe in konz. Schwefelsäure und violett in Alkalien. Seine Lösungen in Natronlauge oder organischen Lösungsmitteln lassen sich leicht mit Natriumdithionit unter Entfärbung reduzieren. An der Luft kehren die Ur-

*) Die Beschreibung des Stammes und seine taxonomische Zuordnung erfolgt an anderer Stelle.

1) H. THURM, unveröffentlicht.

2) Vorl. Mitt.: W. TREIBS und K. ECKARDT, *Naturwissenschaften* **48**, 430 [1961].

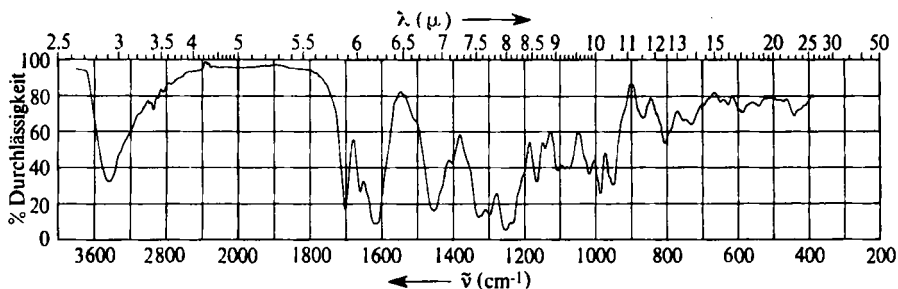
3) Säulentrennung an Al_2O_3 und Kieselgel sowie Gegenstromverteilung waren wegen des starken Komplexbildungsvermögens und der geringen Löslichkeit nicht möglich.

sprungsfarben zurück. In Natronlauge zersetzt es sich schon nach kurzer Zeit, und die beiden anfänglichen Maxima bei 593–596 m μ und 565–568 m μ werden auf 570 und 540 m μ verschoben.

Griseorhodin A wurde nicht nur mit Alkalien, sondern auch durch Säureeinwirkung zersetzt. So entstanden durch Kochen mit Schwefelsäure in Aceton oder methanol. Salzsäure in Dioxan zwei kristallisierte rote Umsetzungsprodukte mit unterschiedlichen R_F -Werten. Auf Grund der leichten Kristallisierbarkeit und der Ähnlichkeit zu Griseorhodin A, die auch eine analoge chemische Struktur erwarten ließ, wurde zunächst das Abbauprodukt mit methanol. Salzsäure (weiterhin kurz HCl-Produkt genannt) näher untersucht.

ÜBER DIE CHEMISCHE KONSTITUTION DES HCl-PRODUKTES

Durch seine Farbreaktionen und Spektren im UV, sichtbaren Bereich und IR gibt sich das HCl-Produkt als typisches Hydroxychinon zu erkennen, wobei es sich genau wie die Griseorhodine durch seine rote Farbe in konz. Schwefelsäure von den meisten Vertretern dieses Typs unterscheidet. Von den drei Banden im C=O-Bereich des IR-Spektrums (Abbild. 1) ist die starke Bande bei 1620/cm aus den bekannten Gründen



Abbild. 1. IR-Spektrum des HCl-Produktes (KBr-Preßling)

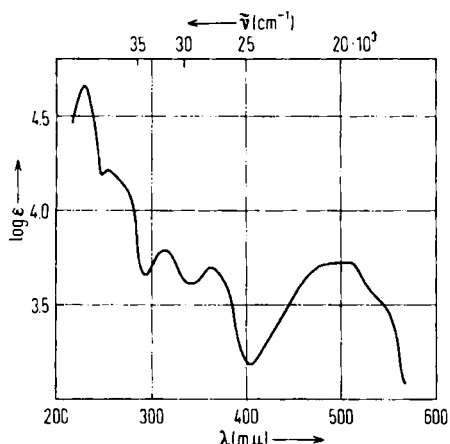
auf mindestens eine brückengebundene Chinoncarbonylgruppe zurückzuführen⁴⁾. Die schwächere Bande bei 1660/cm rührt vermutlich von einem nicht oder weniger gebundenen Teil der Chinongruppe her, während die starke Bande bei 1700/cm zusammen mit der größeren Bandenzahl von 1600–1700/cm im Acetat und Methyl-derivat mindestens eine weitere C=O-Gruppe erwarten lassen. Auch das Absorptionsspektrum im UV und sichtbaren Bereich (Abbild. 2) hat die allgemein für Hydroxychinone charakteristische Form mit ausgeprägtem Minimum bei 400 m μ ⁵⁾.

Durch Redox titration wurde für das HCl-Produkt nach dem Verbrauch von 2 Moll. TiCl_3 (2 Umschlagspunkte) ein Molekulargewicht von 364–384 ermittelt,

⁴⁾ P. YATES, M. J. ARDAO und L. F. FIESER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 650 [1956]; M. St. C. FLETT, J. chem. Soc. [London] **1948**, 1441; M. L. JOSIEN, N. FUSON, J.-M. LEBAS und Th. M. GREGORY, J. chem. Physics **21**, 331 [1953].

⁵⁾ R. A. MORTON und W. T. EARLAM, J. chem. Soc. [London] **1941**, 159; J. H. BIRKINSHAW, Biochem. J. **59**, 485 [1955], sowie L. H. BRIGGS, J. chem. Soc. [London] **1952**, 1718.

wogegen die Mikrohydrierung bei Verbrauch von 1 Mol. H_2 etwa 400 ergab. Darauf bezogen passen die Analysenergebnisse (einschließlich der Methoxyl- und Acetylwerte der Derivate) auf die Summenformeln $C_{17}H_{14}O_9$ mit 3 oder $C_{19}H_{16}O_{10}$ mit 4 OH-Gruppen. Die Chinonstruktur ging aus dem Redoxverhalten gegenüber katalyt. erregtem H_2 oder Natriumdithionit hervor. Nach ZEISEL wurde eine OCH_3 -Gruppe bestimmt, die auch bei alkalischer Verseifung erhalten blieb. Sie entstammt also keiner Methylestergruppe, sondern liegt als methylierte OH-Gruppe vor. Zwei weitere O-Atome werden einer Lactongruppierung zugeordnet.



Abbild. 2
Absorptionsspektrum des HCl-Produktes
in Äthanol
(λ_{\max} 232, 255, 315, 364, 508 m μ)

Bei der Zinkstaubdestillation im Wasserstoff-Strom spaltete sich CO_2 ab, eine Reaktion, die gewöhnlich nur Verbindungen mit einer vorgebildeten $-C \begin{smallmatrix} O \\ \diagup \end{smallmatrix} \begin{smallmatrix} O \\ \diagdown \end{smallmatrix}$ -Anordnung zeigen. Durch Alkalibehandlung des HCl-Produktes wurde eine Carboxylgruppe frei, die sich durch Decarboxylierung in Chinolin mit Cu-Pulver nachweisen ließ. Die neu entstandene HCl-Produktsäure war ebenfalls rot und löste sich im Gegensatz zum HCl-Produkt oder Griseorhodin A leicht in Natriumhydrogencarbonat-Lösung.

Das HCl-Produkt enthält also entweder eine Ester-, Lacton- oder Anhydridgruppierung. Methyl- und Äthylester kommen nicht in Frage, da nur 1 OCH_3 -Gruppe gefunden wurde, ebenso wenig Ester mit länger-kettigen Alkoholen auf Grund der Seitenkettenoxydationen. Eine Anhydridgruppierung läßt sich mit Sicherheit nach den IR-Spektren ausscheiden, so daß ein Lactonring angenommen werden muß. Der direkte Beweis durch Relactonisierung gelang nicht. Nach Verseifung des vollmethylierten HCl-Produktes war jedoch eine neu entstandene OH-Gruppe nachweisbar.

Lactonringe sind in natürlichen Hydroxychinonen selten anzutreffen. Kürzlich wurde ein derartiger Farbstoff aus *Trichophyton megnini* isoliert⁶⁾.

Auf Grund der Reaktion mit 2.4-Dinitrophenylhydrazin muß noch eine Carbonylgruppe vorhanden sein, denn allgemein werden die Chinoncarbonylgruppen solcher

⁶⁾ G. JUST, W. C. DAY und F. BLANK, Canad. J. Chem. 41, 74 [1963].

Verbindungen nicht angegriffen⁷⁾. Möglicherweise liegt sie in Form einer Acetoxygruppe vor, da das HCl-Produkt eine endständige CH₃-Gruppe besitzt und mit Natriumhypoiodit Jodoform gebildet wird.

Sowohl die modifizierte KUHN-ROTH-Oxydation, als auch die Oxydation mit KMnO₄ in Pyridin⁸⁾ ergaben nur 60–80% der ber. Menge für eine CH₃-Gruppe. Papierchromatographisch ließ sich als flüchtige Säure lediglich Essigsäure nachweisen^{9,10)}, so daß im HCl-Produkt zwar eine C-Methylgruppe, aber keine längere C–C-Kette vorhanden ist. Mindestens ein C-Atom ist asymmetrisch, da Acetat und reduziertes Acetat optisch aktiv sind.

Für die Stellung der OH-Gruppen gab es mehrere Hinweise. Wie schon erwähnt, sind nach den IR-Spektren eine oder mehrere OH-Gruppen zur Chinongruppe *peri*-ständig. Darauf deuten auch das Komplexbildungsvermögen und der Farbwechsel von Rot nach Gelb durch Methylierung bzw. Acetylierung hin. Genauere Aussagen wurden durch die Pyroboracetatreaktion^{11,12)} erhalten. Das HCl-Produkt gab mit diesem Reagenz bei Raumtemperatur eine tiefe Rotviolett-färbung und ähnelte in Farbe sowie spektroskopischer Hinsicht von allen mituntersuchten Hydroxychinonen am meisten dem Naphthazarin und Naphthopurpurin (s. Tab.). Es hat demnach mindestens zwei kernständige OH-Gruppen in *peri*-Stellung. (Beim Erhitzen verschoben sich die Banden hypsochrom, was aber auch beim einfachen Naphthazarin gefunden wurde.) Über die Stellung der dritten OH-Gruppe geben spektroskopische Untersuchungen Auskunft.

Reaktion mit Pyroboracetat (Normaltemp.)

Verbindung	Farbe	Maxima in mμ
Naphthopurpurin	rotviolett	(498), 534, 579
Naphthazarin	rotviolett	(496), 535, 576
HCl-Produkt	rotviolett	(483), 517, 563
Griseorhodin A	rotviolett	(485), 515, 564

Die zur Grundkörperermittlung üblichen Zinkstaubmethoden, einschließlich der Zinkstaubschmelze nach E. CLAR¹³⁾, versagten wegen der Zersetzlichkeit unserer Substanzen. Ebenso hatte das zur spektroskopischen Stammkernermittlung¹⁴⁾ hergestellte reduzierend] acetylierte HCl-Produkt, dessen Lösungen im UV-Licht gelbgrün fluoreszierten, nur ein sehr uncharakteristisches Spektrum. In Abbild. 3 ist es jeweils im Vergleich zu den typischen Spektren eines Hydroxynaphtho- und Hydroxy-

⁷⁾ R. H. THOMSON, Naturally Occurring Quinones, S. 119, Butterworths Sci. Publ. London 1957; J. H. LISTER, C. H. EUGSTER und P. KARRER, Helv. chim. Acta 38, 215 [1955].

⁸⁾ H. BROCKMANN und W. LENCK, Chem. Ber. 92, 1880 [1959].

⁹⁾ C. F. GARBERS, H. SCHMID und P. KARRER, Helv. chim. Acta 37, 1336 [1954].

¹⁰⁾ R. ENTSCHEL, C. H. EUGSTER und P. KARRER, Helv. chim. Acta 39, 1263 [1956].

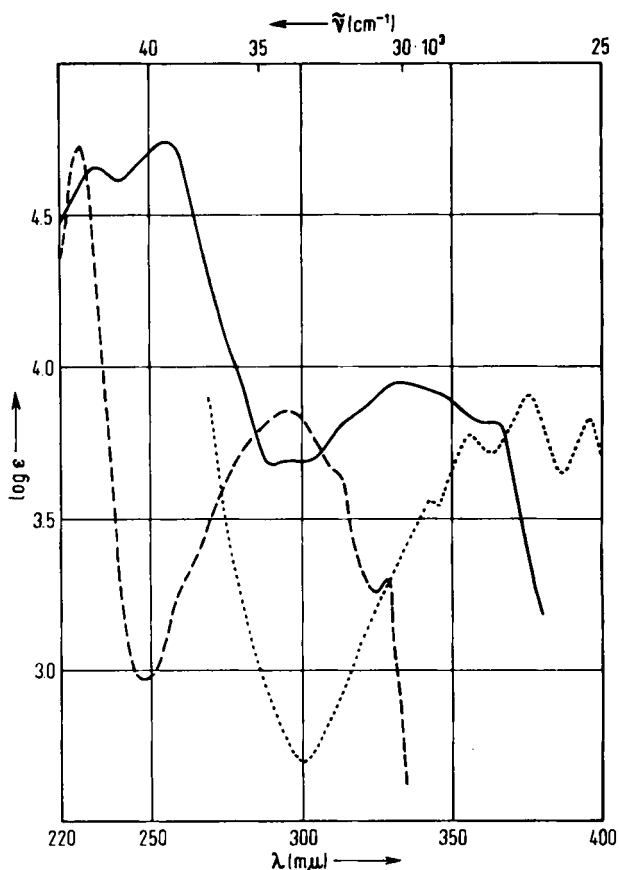
¹¹⁾ O. DIMROTH und F. RUCK, Liebigs Ann. Chem. 446, 97, 123 [1925].

¹²⁾ H. BROCKMANN und R. KÖHNE, unveröff., H. BROCKMANN und B. FRANCK, Chem. Ber. 88, 1792 [1955].

¹³⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 72, 1645 [1939].

¹⁴⁾ H. BROCKMANN und G. BUDDÉ, Chem. Ber. 86, 432 [1953].

anthrachinons, die im wesentlichen in Frage kamen, aufgetragen worden. Nach Lage und Form der Maxima kam davon nur das Acetoxynaphthalin als Grundgerüst in Betracht, worauf auch die Ergebnisse der Pyroboracetatreaktion schon hingedeutet hatten. In einigen weiteren Vergleichen (Abbild. 4 und 5) zeigt sich eine direkte Verwandtschaft unserer Substanzen mit Naphthopurpurin, denn allgemein werden auch in den Absorptionsspektren komplizierterer Naturchinone die charakteristischen Spektrentypen der zugrundeliegenden, einfachen Hydroxychinone wiedergefunden. Die Lage des langwelligen Maximums bei $351\text{ m}\mu$ in Abbild. 5 ist typisch für Naphthochinone mit zwei acetylierten, *peri*-ständigen OH-Gruppen¹⁵⁾.



Abbild. 3. UV-Spektrum des reduzierend acetylierten HCl-Produktes — (λ_{max} 234, 257, 331, 362 mμ) im Vergleich zu dem reduzierend acetylierten Naphthazarin - - - (λ_{max} 227, 295, 311, 328 mμ, beide in Äthanol) und dem reduzierend acetylierten Alizarin (λ_{max} 343, 355, 375, 395 mμ in Dioxan)

¹⁵⁾ A. KILLEN MACBETH, J. R. PRICE und F. L. WINZOR, J. chem. Soc. [London] 1935, 325.

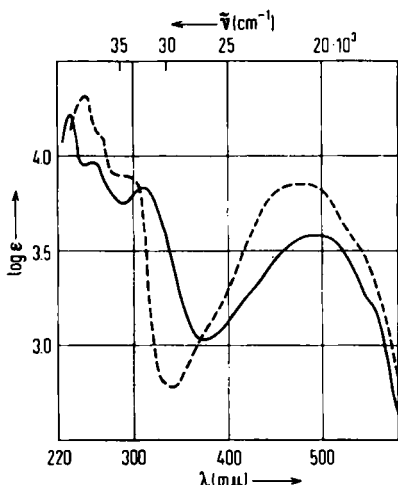


Abb. 4

Absorptionsspektren in Äthanol:

HCl-Produkt-Säure ———

 $(\lambda_{\max} 234, 256, 312, 480-500 \text{ m}\mu)$,

Naphthopurpurin - - -

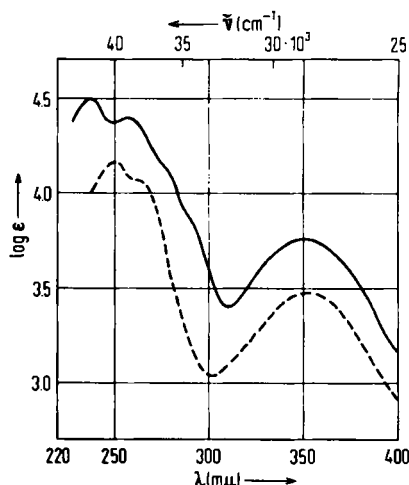
 $(\lambda_{\max} 250, 265, 290, 460-490 \text{ m}\mu)^{16)}$ 

Abb. 5

UV-Spektren

der Acetate des HCl-Produktes ———

 $(\lambda_{\max} 237, 258, 351 \text{ m}\mu)$

und des Naphthopurpurins - - -

 $(\lambda_{\max} 249, 265, 352 \text{ m}\mu)$ in Äthanol

In Abbild. 6 werden noch die Spektren der roten Lösungen des Naphthopurpurins und des HCl-Produktes in konz. Schwefelsäure verglichen, worin alle Hydroxychinone charakteristische Farbreaktionen und Spektrenformen geben¹⁷⁾.

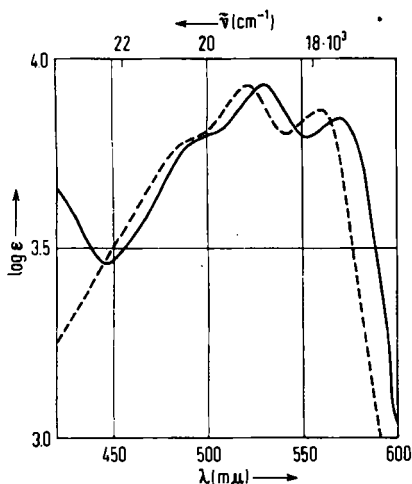


Abb. 6

Absorptionsspektren
des HCl Produktes ——— $(\lambda_{\max} (497), 530, 570 \text{ m}\mu)$ und des

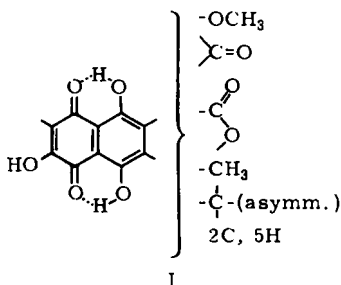
Naphthopurpurins - - -

 $(\lambda_{\max} (495), 524, 559 \text{ m}\mu)$ in konz. Schwefelsäure

¹⁶⁾ Vgl. auch J. W. H. LUGG, A. KILLEN MACBETH und F. L. WINZOR, J. chem. Soc. [London] 1937, 1597; B. D. ASTILL und J. C. ROBERTS, ebenda 1953, 3303. Das HCl-Produkt eignete sich nicht zum Vergleich, da es ein auf die verseifbare Gruppe zurückzuführendes, zusätzliches Maximum bei 364 mμ hatte (s. Abbild. 2).

¹⁷⁾ D. B. MEEK, J. chem. Soc. [London] 1917, 969.

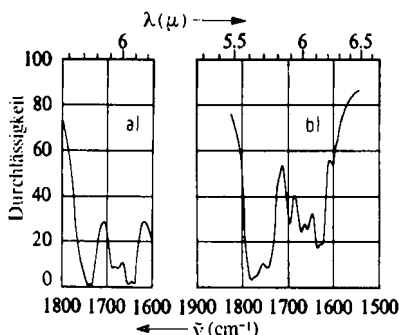
Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß das HCl-Produkt auf Naphthopurpurin (2.5.8-Trihydroxy-naphthochinon-(1.4)) aufgebaut ist. Bezogen auf die



Summenformel C₁₇H₁₄O₉ kann daraus, zusammen mit den funktionellen Gruppen, für das HCl-Produkt die vorläufige Partialformel I (oder Tautomeres) aufgestellt werden.

Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß noch eine weitere OH-Gruppe im Molekül enthalten sein kann. Damit müßte die C₁₉-Formel angenommen werden, auf die ja die Analysenergebnisse ebenfalls passen. Vorwiegend ist es die Tatsache, daß durch Acetylierung zwei neue Banden im C=O-Bereich der IR-Spektren um 1740/cm und 1785/cm neu auftauchen, während

auf Grund der 3 kernständigen OH-Gruppen nur eine gemeinsame Acetatbande bei 1785/cm zu erwarten wäre. Dies wurde noch einmal durch einige Vergleichsuntersuchungen mit analogen Acetaten bestätigt. Eine Bande bei 1745/cm ist aber typisch für eine alkoholische Acetat-Gruppe. Es hat sich jedoch gezeigt, daß diese intensive Bande um 1740/cm auch durch Methylierung des HCl-Produktes neu auftaucht. Demnach wäre ihr Erscheinen lediglich auf die Blockierung der OH-Gruppen zurückzuführen. Möglicherweise geht diese Bande auf die Lactongruppe zurück, die im HCl-Produkt ebenfalls durch eine H-Brücke gebunden sein kann und entsprechend verschoben bei 1700/cm absorbiert. Bis zur endgültigen Klärung kann die C₁₉-Formel nicht verworfen werden.



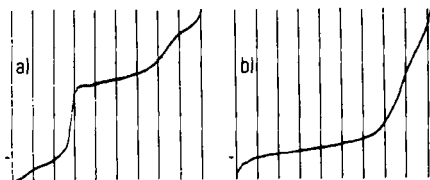
Abbild. 7
IR-Spektren von Methylderivat (a)
und Acetat (b) des HCl-Produktes

GRISEORHODIN A

Im Gegensatz zum HCl-Produkt nahm das Antibioticum bei der Mikrohydrierung 2 Moll. H₂ auf, wobei ein Molekulargewicht von 500–520 gefunden wurde. Mit den Analysenwerten errechnet sich daraus die Summenformel C₂₄H₂₀O₁₂, im Einklang mit den Analysendaten der Derivate. Da die Farbreaktionen und die IR-Banden im C=O-Bereich mit denen des HCl-Produktes nahezu identisch waren, wurde auch der gleiche Chromophor erwartet. Das bestätigte sich durch die Ergebnisse der Pyroboracetatreaktion und der reduzierenden Acetylierung. Mit Pyroboracetat gab Griseorhodin A eine Rotviolettfrärbung mit Maxima bei 515 und 564 mμ. Es enthielt also ebenfalls mindestens zwei zur Chinongruppierung *peri*-ständige OH-Gruppen. Die organischen Lösungen des reduzierend acetylierten Antibioticums fluoreszieren im UV-Licht

grüngelb und haben nahezu das gleiche Absorptionsspektrum, wie das reduzierend acetylierte HCl-Produkt. Bei beiden wurden die C-Werte höher gefunden als berechnet.

Der Beweis dafür, daß die Chinongruppe tatsächlich reduzierend acetyliert war, ließ sich leicht durch die Polarographie erbringen. Im Gegensatz zu den Ausgangsverbindungen wiesen die polarographischen Aufnahmen der reduzierend acetylierten Produkte keine reversiblen Chinonstufen¹⁸⁾ mehr auf (Abbild. 8). Weiterhin zeigte eine durch schonendere hydrierende Acetylierung erhaltene Verbindung das gleiche Absorptionsspektrum.

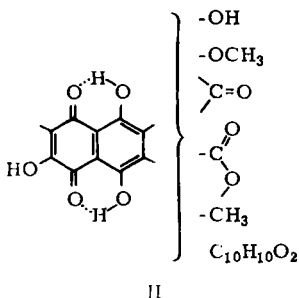


Abbild. 8

Polarogramme des Griseorhodins A
(a) und der reduzierend acetylierten
Verbindung (b)

(Bedingungen: $c = 2 \cdot 10^{-4} m$ in 20-proz.
Dimethylformamidlösung, pH 8.65
(Brit.-Rob.-Puffer) gegen NCE; 25°,
ab 0 V, $\Delta\pi = 0.2 V$)

Wie bei den bisherigen Vergleichen stimmen auch die Spektren des Griseorhodin A in Schwefelsäure sowie seines alkalischen Verseifungsproduktes in Äthanol mit denen des HCl-Produktes fast überein. Demnach muß sich auch das Antibioticum selbst auf Naphthopurpurin aufbauen. Insgesamt enthält es nach den Analysenwerten des Acetates, Benzoates und Methylderivates jedoch 4 OH-Gruppen. Die vierte muß außerhalb des Kernes stehen, weil sie sonst die Spektren verändern würde. Damit sind alle OH-Gruppen erfaßt, denn die IR-Spektren der Derivate in Chloroform enthalten keine OH-Banden mehr.



An funktionellen Gruppen wurde eine alkalisch nicht angreifbare OCH₃- und eine C-CH₃-Gruppe bestimmt. Als flüchtige Säure ließ sich bei der Oxydation mit Chromschwefelsäure und KMnO₄ nur Essigsäure nachweisen. Eine Lacton- und eine Carbonylgruppe wurden auf gleichem Wege nachgewiesen wie beim HCl-Produkt, so daß sehr wahrscheinlich im Griseorhodin A ein vollständiges Molekül des HCl-Produktes enthalten ist. Bezogen auf die Summenformel C₂₄H₂₀O₁₂ kann daher für das Antibioticum Griseorhodin A die vorläufige Teilformel II angenommen werden.

Herrn Prof. Dr. H. KNÖLL und Herrn Prof. Dr. G. DREFAHL möchte ich für die großzügige Unterstützung der Arbeit danken. Frau Dr. G. BRADLER danke ich für die Übernahme der mikrobiologischen Arbeiten.

¹⁸⁾ H. BERG und K. ECKARDT, in Vorbereitung.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung der Rohsubstanz: 300 l Nährmedium, bestehend aus 1 % Glucose, 0.5 % Fleisch-extrakt, 0.5 % Caseinpepton, 0.5 % NaCl und 0.01 % Backhefe wurden auf pH 7.2 eingestellt, 60 Min. bei 125° sterilisiert und mit einer 48 Stdn. alten Submerskultur des Stammes JA 2640 beimpft. Die Fermentation verlief unter Belüftung und Rühren bei Einhaltung der Temp. von 27—29°. Die Antibiotica-Bildung erreichte mit 72—96stdg. Kulturdauer das Maximum, wobei der pH-Wert auf 7.5—8.0 anstieg. Nach Ansäuern auf pH 3.5—4.0 wurde das abgeschleuderte Mycel in Fraktionen zu 10 l Aceton extrahiert und i. Vak. eingengt. Die ausgefallene Rohsubstanz war nach Waschen mit Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther je nach Fraktion braun bis rot gefärbt.

Isolierung von Griseorhodin A: Die Rohsubstanz wurde mit Dioxan ausgekocht und heiß von den braunvioletten Rückständen abgesaugt. Nach Einengen und Kühlen fiel Griseorhodin A in Form von voluminösen Niederschlägen aus, die abgesaugt und mehrmals mit heißem Methanol ausgezogen wurden. Durch wiederholtes Umlösen aus Dioxan erhielt man je nach Qualität der eingesetzten Rohfraktion unterschiedliche Mengen reines Griseorhodin A als amorphe, dunkelrote Substanz. Schmp. 280—282° (Zers.). IR-Banden im C=O-Bereich: 1620, 1660, 1700/cm (KBr).

$C_{24}H_{20}O_{12}$ (500.4) Ber. C 57.52 H 4.02 1 OCH₃ 6.20 1 CH₃ 3.00
Gef. C 57.26 H 3.85 OCH₃ 6.03 CH₃ 2.80

R_F-Werte: In frisch bereitetem, formamidgesättigtem Benzol 0.21, in CHCl₃ 0.91—0.92 (Rundfilterchromatographie, Papier Schleicher-Schüll Nr. 2043 b unvorbehandelt).

Katalyt. Mikrohydrierung: Ca. 5—15 mg Griseorhodin A bzw. HCl-Produkt wurden in einer etwas veränderten Apparatur nach WEYGAND-WERNER mit 200—500 mg Pd/BaSO₄-Katalysator in 8—10 ccm n NaOH hydriert. H₂-Aufnahme je nach Rührgeschwindigkeit 10—40 Min.

Redox titrationen: Die Substanzen (ca. 10—15 mg HCl-Produkt oder sein Acetat) wurden in einer Meßzelle in Essigsäure (natriumacetatgepuffert) mit salzsaurem TiCl₃ titriert. Pt- und Kalomelelektrode, N₂-Strom, $t = 50^\circ$, Bestimmungsdauer 3—5 Stdn.

Oxydation mit Chromsäure (Makroversuche): 70—100 mg Griseorhodin A oder HCl-Produkt wurden mit 15 ccm Chromschwefelsäure¹⁹⁾ in einer Acetylbestimmungsapparatur erhitzt und im Laufe von 90 Min. unter Wasser-Nachgabe ca. 30 ccm abdestilliert. Die Titration der flüchtigen Säure erfolgte mit 0.02 n NaOH gegen Phenolphthalein. Zur Papierchromatographie wurde das neutralisierte Destillat i. Vak. zur Trockne gedampft, der farblose Rückstand in ca. 3 ccm ammoniakal. Methanol aufgenommen und absteigend chromatographiert. (Systeme: n-Propanol/1.5 n (NH₄)₂CO₃ — 3 n NH₄OH (3:1) und n-Butanol/Isopropylalkohol/1.5 n (NH₄)₂CO₃ — 3 n NH₄OH (1:1.5:1)^{10,20)}. Vorbehandeltes Papier, Methylrotreagenz.)

Pyroboracetatreaktion: Die Hydroxychinone wurden in Acetanhydrid gelöst und bei Raumtemperatur mit der gleichen Menge der Reagenzlösung (hergestellt aus 5 g B₂O₃ und 100 ccm trockenem Acetanhydrid) versetzt. Die Absorptionsspektren wurden anschließend mit dem Zeiss-Universalspektrophotometer gemessen.

HCl-Produkt aus Griseorhodin A: 300 mg Griseorhodin A wurden heiß in 25 ccm Dioxan gelöst und mit 25 ccm gesätt. methanol. Salzsäure 6 Stdn. gekocht. Nach Stehenlassen über Nacht und Einengen auf ca. 30 ccm fiel im Kühlschrank ein roter Niederschlag aus, der abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet wurde. Ausb. ca. 200 mg rote Nadelchen

¹⁹⁾ Nach E. WIESENBERGER, Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 33, 51 [1948].

²⁰⁾ H. KALBE, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 19 [1954].

(Dioxan). Schmp. 269—271° (Zers.) (verbesserter Schmp. gegenüber l. c.²¹). Löslich in Dioxan, Pyridin; wenig löslich in Benzol, Alkoholen, Chloroform; unlöslich in Wasser und Petroläther. IR-Banden im C=O-Bereich: 1620, 1660, 1700/cm (KBr).

$C_{17}H_{14}O_9$ (362.3) Ber. C 56.32 H 3.86 1OCH₃ 8.57 1CH₃ 4.14
Gef. C 56.24 H 4.15 OCH₃ 8.70 CH₃ 2.89

Acetat des HCl-Produktes: 500 mg HCl-Produkt in 15 ccm reinem Pyridin wurden bei Raumtemperatur mit dem halben Vol. *Acetanhydrid* versetzt. Die Lösung hellte sich auf. (Bei längerem Stehenlassen wurde das Reakt.-Gemisch schwarz.) Zur Zersetzung wurde die Mischung in ca. 200 ccm kaltes Wasser gegeben, wobei ein goldgelber Niederschlag ausfiel. Ausb. ca. 500 mg, orangefarbene Mikrokristalle aus Benzol/Ligroin, Schmp. 210—212°. Die Substanz ist leicht löslich in Eisessig sowie Chloroform; löslich in Methanol und Benzol; unlöslich in Wasser und Petroläther. IR-Banden im C=O-Bereich: 1640, 1660, 1675, 1700, 1745, 1785/cm (CHCl₃).

$C_{23}H_{20}O_{12}$ (488.4) Ber. C 56.55 H 4.10 1OCH₃ 6.34 3CH₃CO 26.40
Gef. C 56.04 H 4.15 OCH₃ 5.70 CH₃CO 28.83²¹⁾
Mol.-Gew. 490—540 (Redoxtitration, RAST)

Das gleiche Acetat war in Acetanhydrid mit einem Tropfen konz. Schwefelsäure erhältlich.

Reduzierende Acetylierung des HCl-Produktes: 350 mg HCl-Produkt (oder sein Acetat) wurden in 40 ccm trockenem *Acetanhydrid* gelöst und mit 1 g frisch geschmolzenem *Natriumacetat* sowie 3 g *Zn-Staub* 2 Stdn. gekocht. Nach Zersetzung in Wasser wurde das Reaktionsprodukt mit Chloroform extrahiert und nach Einengen der filtrierten, trockenen Lösung mit Petroläther gefällt. Zur Reinigung wurde in Chloroform aufgenommen und an vorbehandeltem Al₂O₃²²⁾ mit CHCl₃ chromatographiert (Al₂O₃ mit Benzol eingeschlämmt). Aus der grüngelb fluoreszierenden Hauptzone ließ sich nach Einengen und Füllen mit Petroläther eine hellgelbe Substanz gewinnen. Hellgelbe Mikrokristalle aus Äthanol. Schmp. 157—160°. Leicht löslich in Chloroform, Dioxan, Benzol, Aceton, mäßig löslich in Alkoholen und unlöslich in Wasser und Petroläther. IR-Banden im C=O-Bereich: 1645, 1680, 1745, 1785/cm (CHCl₃).

Gef. C 58.63 H 4.57 OCH₃ 4.59 CH₃CO 37.02²¹⁾

Methylderivat des HCl-Produktes: 700 mg HCl-Produkt, in 90 ccm Aceton suspendiert, wurden mit 44 g Kaliumcarbonat und 26 ccm reinem *Dimethylsulfat* 20 Stdn. im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe der gleichen Mengen Kaliumcarbonat und Dimethylsulfat wurde 3 Stdn. gekocht und erneut 16 Stdn. stehengelassen. Zur Aufarbeitung versetzte man mit Wasser und schüttelte mit Benzol aus. Die gelbbraune Benzollösung wurde mehrere Male mit *n*/10 NaOH und Wasser gewaschen und nach Trocknen i. Vak. zur Trockene gedampft (zuletzt i. Hochvak. bei 70°). Der grünschwarze Rückstand wurde mit 20 ccm Benzol aufgenommen und nach Filtration daraus mit Petroläther die gelbe Rohsubstanz gefällt. Durch Säulenchromatographie an vorbehandeltem Al₂O₃²²⁾ (eingeschlämmt mit Benzol) mit Chloroform/Benzol (1 : 1) trennten sich 2 gelbe Zonen ab. Aus der zitronengelben Lösung der untersten Zone ließ sich durch Füllen mit Petroläther das hellgelbe, nach Umkristallisation aus Benzol/Hexan orangefarbene *Methylderivat* gewinnen. Schmp. 167—170° (Zers.). Es löste sich leicht in Benzol, Chloroform, Aceton, Alkoholen, jedoch nicht in Wasser und Petroläther. IR-Banden im C=O-Bereich: 1640, 1650, 1675, 1695, 1745/cm (CHCl₃).

$C_{20}H_{20}O_9$ (404.4) Ber. C 59.45 H 4.96 4OCH₃ 30.70
Gef. C 59.69 H 5.15 OCH₃ 31.60 Mol.-Gew. 403 (RAST)

²¹⁾ Alle Acetylwerte sind ohne Blindwertabzug, die bei Hydroxychinonen allgemein hoch sind. Vgl. dazu H. BROCKMANN und G. BUDDÉ, Chem. Ber. 86, 432 [1953].

²²⁾ In Wasser aufgeschlämmt und auf pH 4 angesäuert. Nach 2stdg. Rühren wurde abgesaugt, neutral gewaschen und bei 37° getrocknet.

2,4-Dinitrophenylhydrazon: Zu 200 mg der gelben *Methylverbindung* in wenig Äthanol wurde eine Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (in konz. Schwefelsäure/Äthanol) zugefügt, wonach schon bei Raumtemperatur eine Rotfärbung eintrat. Die nach kurzem Erhitzen und Abkühlen erhaltenen Niederschläge wurden aus Äthanol kristallisiert, jedoch nicht vollständig analysenrein erhalten. Schmp. 221—223° (Zers.).

$C_{26}H_{24}N_4O_{12}$ (584.5) Ber. N 9.60 Gef. N 10.74

Alkalische Verseifung des HCl-Produktes: 1 g HCl-Produkt wurde mit ca. 50 ccm 1 n methanol. NaOH digeriert und 3 Stdn. gekocht. Durch Eiskühlung und Ansäuern fiel ein dicker, roter Niederschlag aus, der abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wurde. Zur Reinigung wurde die Substanz von der Fritte in Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst, nach Filtration angesäuert und erneut abfiltriert. Ausb. nach Waschen mit wenig kaltem Wasser und Methanol ca. 800 mg. (Weitere Mengen waren aus den sauren Mutterlaugen durch Ausschütteln mit Essigester und Überführung in Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewinnbar.) Rotes, amorphes Pulver aus Äthanol. Schmp. 268—270° (Zers.), wenn ab 260° schnell erhitzt wird, sonst Zers. unterhalb des Schmp. Sehr leicht löslich in Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gut löslich in Essigester und Alkoholen, mäßig in Wasser und sehr wenig in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff sowie Benzol.

$C_{17}H_{17}O_{10}$ (381.3) Ber. C 53.55 H 4.46 $1OCH_3$ 8.14 $1CH_3$ 3.94
Gef. C 53.85 H 4.52 OCH_3 7.98 CH_3 2.55

Acetat des Griseorhodin A: Die Darstellung wie beim Acetat des HCl-Produktes ergab goldgelbe Mikrokristalle aus Benzol/Ligroin, Schmp. 214—216°. Leicht löslich in Chloroform, Eisessig, Benzol, Essigester, weniger in Alkoholen, Tetrachlorkohlenstoff und praktisch unlöslich in Wasser oder Phosphatpuffer pH 6.8. IR-Banden im C=O-Bereich: 1640, 1660, 1675, 1697, 1741, 1785/cm ($CHCl_3$).

$C_{32}H_{28}O_{16}$ (668.6) Ber. C 57.50 H 4.19 $1OCH_3$ 4.64 $4CH_3CO$ 25.57
Gef. C 57.58 H 4.10 OCH_3 4.48 CH_3CO 25.84²¹⁾
Mol.-Gew. 639 (RAST)

Reduzierende Acetylierung des Griseorhodin A: 300—400 mg Griseorhodin A bzw. Acetat wurden in 40 ccm trockenem Acetanhydrid gelöst und wie beim reduzierend acetylierten HCl-Produkt umgesetzt und gereinigt. Zitronengelbe Kristalle vom Schmp. 165—166°. IR-Banden im C=O-Bereich: 1640, 1675, 1740, 1780/cm ($CHCl_3$).

Gef. C 59.56 H 4.68 OCH_3 4.24 CH_3CO 37.15²¹⁾

Ging man vom Griseorhodin A-acetat aus, so trennte sich an der Säule eine zweite, orange-farbene Zone ab. Die daraus erhaltene Substanz kristallisierte aus Eisessig/Wasser in orange-farbenen Nadelrosetten. Schmp.: Sintern bei 279°, Schmelzen bei 285—287°. Leicht löslich in Chloroform, Benzol, Eisessig. Wenig löslich in Äthanol und unlöslich in Wasser und Petroläther. Die Lösungen fluoreszieren im UV grüngelb.

λ_{max} 232, 273, 326, 380, (405) m μ (C_2H_5OH). IR-Banden im C=O-Bereich: 1610, 1635, 1665, 1730, 1785/cm (KBr)²³⁾.

Gef. C 60.95 H 4.74 OCH_3 4.25 CH_3CO 36.74²¹⁾

Methylderivat des Griseorhodin A: 450 mg Griseorhodin A, suspendiert in 45 ccm trockenem Aceton, wurden mit 22 g wasserfreiem Kaliumcarbonat und 13.5 ccm Dimethylsulfat 30 Stdn.

²³⁾ Diese Substanz enthielt zwar ebenfalls keine Chinongruppe mehr (Polarogramm), war jedoch noch weiter umgesetzt worden. Auf Grund der veränderten Spektren konnte sie zur Grundkörperermittlung nicht verwendet werden.

im Dunkeln belassen. Nach Zusatz der gleichen Menge Kaliumcarbonat und Dimethylsulfat sowie 2 stdg. Kochen schied sich auf Zusatz von Wasser zur filtrierten Lösung ein gelbes Öl ab. Extraktion und chromatographische Reinigung erfolgten wie bei der Methylierung des HCl-Produktes. Orangegelbe Substanz, Schmp. 173–176° (Zers.).

$C_{28}H_{28}O_{12}$ (556.5) Ber. C 60.40 H 5.04 $5OCH_3$ 27.80
Gef. C 60.23 H 4.83 OCH_3 25.20

Griseorhodin A-benzoat: 100 mg *Griseorhodin A* in 10 ccm Pyridin wurden tropfenweise unter Schütteln mit *Benzoylchlorid* und Pyridin versetzt, bis eine Probe in Wasser rein gelb ausfiel. Der durch Eintragen in 100 ccm Wasser ausgefallene Niederschlag wurde mit Benzol aufgenommen. Nach mehrmaligem Umkristallisieren der daraus gewonnenen Substanz erhielt man das *Benzoat* als zitronengelbe Oktaeder. Schmp. 215–217° (aus Benzol). Leicht löslich in Aceton, Benzol, weniger in Alkoholen und unlöslich in Wasser und Petroläther.

$C_{32}H_{36}O_{16}$ (916.9) Ber. C 68.00 H 3.93 $1OCH_3$ 3.38 $4C_6H_5CO$ 45.8
Gef. C 67.54 H 4.09 OCH_3 3.27 C_6H_5CO 45.3
