

## 259. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

25. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>, neuer Antibiotika der Sideromycin-Gruppe

von H. Bickel, E. Gäumann, G. Nussberger, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser,  
A. Wettstein und H. Zähler.

(6. X. 60)

Kulturfiltrate des Actinomycetenstammes ETH 9578<sup>2)</sup> der Species *Streptomyces griseoflavus* (KRAINSKY) WAKSMAN *et* HENRICI, den wir aus einer bei Boston, USA, gesammelten Bodenprobe isolierten, zeigten *in vivo* Wirksamkeit gegen GRAM-positive Erreger, insbesondere gegen *Staphylococcus aureus*. Die Untersuchungen, die sich infolge der aussergewöhnlichen Eigenschaften der Wirksubstanzen schwierig gestalteten, führten zur Isolierung von neuen Antibiotika, die wir wegen ihres Gehaltes an dreiwertigem Eisen als Ferrimycine bezeichnen. Sie gehören zu den Sideromycinen, einer kürzlich zusammenfassend beschriebenen, neuen Gruppe von Antibiotika<sup>3)</sup>.

Antibiotisch aktive Kulturfiltrate des Stammes ETH 9578 oder Lösungen von Ferrimycinpräparaten sind über einen weiten pH-Bereich instabil<sup>4)</sup> (Fig. 1). Um eingehende *Anreicherungsversuche* ausführen zu können war es deshalb erforderlich, das mit den üblichen Lösungsmitteln nicht extrahierbare Antibiotikum möglichst rasch aus den Kulturfiltraten in Rohkonzentrate definierter Aktivität überzuführen. Dies gelang vorerst durch Adsorption der Wirksubstanzen an säuregewaschene Aktivkohle und Elution mit essigsäuren Butanol-Methanol-Gemischen. Das dabei gewonnene, bei tiefer Temperatur haltbare Rohferrimycin enthielt die im Kulturfiltrat nachweisbare *in-vivo*-Aktivität. Es bestand aus mindestens 2 Komponenten – einer Hauptkomponente A und einer Nebenkompente B<sup>5)</sup> –, die papierchromatographisch und papierelektrophoretisch im Vergleich zu einer Reihe bekannter, hydrophiler Antibiotika charakterisiert wurden (Tabelle 1).

Anreicherungsversuche mit Rohferrimycin führten zum nachfolgend beschriebenen *Isolierungsverfahren* für Ferrimycin A: Kulturfiltrate mit 2000–5000 Aktivitätseinheiten (E) pro ml<sup>6)</sup> wurden mit Oxalsäure, unter Abtrennung von Calciumoxalat, auf pH 4,0 eingestellt. Aus Ansätzen bis zu 6000 l liessen sich darauf die antibiotischen Wirksubstanzen im Säulenverfahren an partiell mit Natronlauge

<sup>1)</sup> 24. Mitt.: H. BICKEL, B. FECHTIG, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & E. VISCHER, *Helv.* **43**, 901 (1960).

<sup>2)</sup> H. ZÄHNER, R. HÜTTER & E. BACHMANN, *Arch. Mikrobiol.* **36**, 325 (1960).

<sup>3)</sup> H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, *Experientia* **16**, 129 (1960).

<sup>4)</sup> Vgl. jedoch auch Angaben über die Stabilität der reinen Ferrimycine auf Seite 2111.

<sup>5)</sup> Ferrimycin B wurde nicht weiter untersucht.

<sup>6)</sup> Definition der Aktivitätseinheit E siehe exper. Teil, S. 2112.

neutralisiertem Amberlite IRC 50 adsorbieren, durch methanolische Salzsäure eluieren, aus den eingeeengten Eluaten mittels Phenol-Chloroform-Gemischen extrahieren und schliesslich mit Lipoidlösungsmitteln auf Trägerstoffe in haltbarer Form in einer Aktivität von 12000 E/mg ausfällen. Durch einfache Fällungs- und Verteilungsoperationen mit Phenol-Chloroform-Gemischen erhielt man daraus Ferrimycinpräparate von 60000 E/mg in Form dunkelbrauner Pulver. Sie zeigten im Tierversuch gegen *Staph. aureus* eine hohe, mit der Wirksamkeit von Penicillin vergleichbare Aktivität, enthielten jedoch neben dem antibiotischen Hauptprodukt

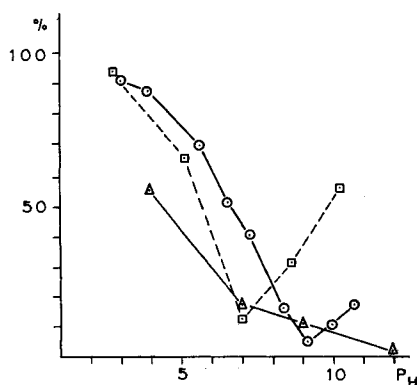


Fig. 1. Antibiotische Aktivität von Ferrimycinlösungen nach 24-stündigem Stehenlassen bei verschiedenen pH-Werten (25°). Aktivität bei Beginn des Versuches = 100%.

-△-△- Kulturfiltrat mit 2,5 E/mg.

-○-○- Ferrimycin (60000 E/mg) in wässrigen Pufferlösungen (THEORELL, STENHAGEN).

-□-□- Ferrimycin A<sub>1</sub> (1 000 000 E/mg) in wässrigen Pufferlösungen (THEORELL, STENHAGEN).

Tab. 1. Papierchromatographie und Papierelektrophorese von Ferrimycin im Vergleich zu bekannten Antibiotika. Bioautographischer Nachweis mit *Staph. aureus*.

| Antibiotikum                | I    | II   | III  | IV  |
|-----------------------------|------|------|------|-----|
| Ferrimycin A . . . . .      | 0,40 | 0,42 | 0,78 | 3,7 |
| Ferrimycin B . . . . .      | 0,55 | 0,52 | 0,78 | 3,7 |
| Streptomycin-sulfat . . . . | 0,04 | 0,25 | 0,33 | 6,2 |
| Neomycin-B-sulfat . . . . . | 0    | 0,04 | 0,10 | 6,2 |
| Neomycin-C-sulfat . . . . . | 0    | 0,04 | 0,10 | 6,2 |
| Kanamycin-sulfat . . . . .  | 0    | 0,08 | 0,17 | 6,2 |
| Viomycin-sulfat . . . . .   | 0    | 0,06 | 0,13 | 5,5 |

I: Rf-Werte in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5).

II: Rf-Werte in Äthanol/Wasser (3:1) + 2% NaCl.

III: Rf-Werte in n-Propanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (15:10:3:12).

IV: cm Laufstrecke in Richtung Kathode nach 2 Std. Elektrophorese in  $\frac{n}{3}$  Essigsäure bei 220 Volt.

Ferrimycin A und neben dem in untergeordneter und je nach Ansatz in variierender Menge auftretenden Ferrimycin B noch überwiegend ein komplexes Gemisch antibiotisch inaktiver Stoffe.

Versuche zur weiteren Reinigung solcher Präparate mittels Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen ergaben bestenfalls eine 5fache Anreicherung. Hingegen

konnte durch CRAIG'sche Verteilung in einem Benzylalkohol-n-Butanol-Salzsäure-Kochsalz-System, unter Abtrennung der Komponente B, aus den Spitzenfraktionen Ferrimycin A von bis zu 600 000 E/mg erhalten werden. Allerdings erwies sich auch dieses Trennsystem, wie die analytische Auswertung ergab (vgl. Fig. 2), als ungenügend selektiv zur Herstellung von reinem Ferrimycin A.

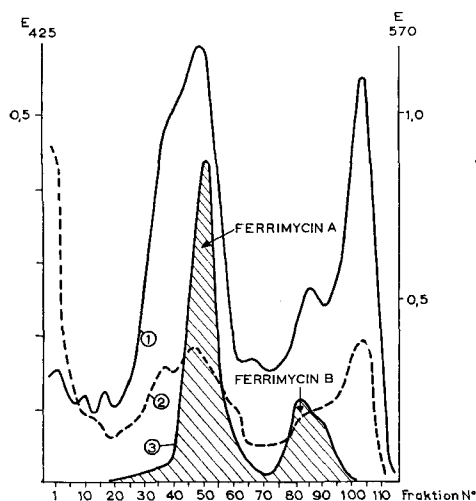


Fig. 2. Gegenstromverteilung von Ferrimycin (60 000 E/mg) über 115 Stufen im System Benzylalkohol-n-Butanol/0,02N HCl/ges. wäss. NaCl-Lsg. (10:5:15:3).

Kurve 1: Extinktion (1 cm) bei 425 mμ.

Kurve 2: Ninhydrinfarbreaktion, Extinktion (1 cm) bei 570 mμ.

Kurve 3. Relative antibiotische Aktivität (*Staph. aureus*) der einzelnen Fraktionen.

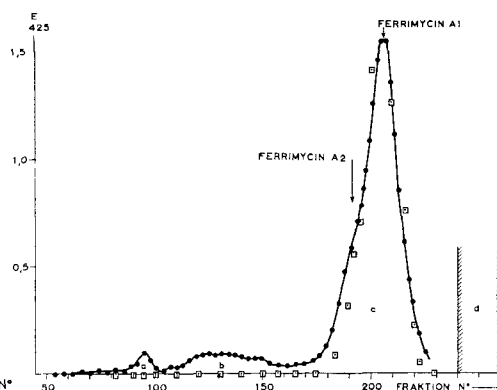


Fig. 3. Chromatographie von Ferrimycin A (310 000 E/mg) an Dowex 50 WX<sub>2</sub>.

●—●— Extinktion (1 cm) bei 425 mμ.  
□—□— Relative antibiotische Aktivität (*Staph. aureus*).

Ferrimycin-A-Präparate mit 300 000 E/mg, die wir routinemässig in 60–70% Aktivitätsausbeute aus solchen Verteilungen erhielten, wurden deshalb an schwach vernetzten Ionenaustauschern vom Sulfonsäure-Typus (Dowex 50 WX<sub>2</sub>) unter Verwendung von Ammoniumacetatpuffer (pH 4,6) in Ansätzen bis zu 200 g chromatographiert (vgl. Fig. 3). Dabei liessen sich 3 antibiotisch inaktive, gefärbte Zonen abtrennen: Ferrioxamin B<sup>3)</sup> (Zone a), eine violett gefärbte Zone b mit Vitamin-B<sub>12</sub>-Wirksamkeit und eine braun gefärbte, unter den angewandten Bedingungen nicht eluierbare Zone d. Die aus der antibiotisch aktiven Hauptbande c isolierten Präparate von Ferrimycin A (650 000 E/mg) enthielten, wie sich durch Gegenstromverteilung (Fig. 4) sowie durch Papierelektrophorese und Papierchromatographie zeigen liess, immer noch Beimengungen antibiotisch inaktiver Stoffe, insbesondere eine lipophilere Komponente, die wir wegen ihrer Antisideromycin-Wirksamkeit<sup>2)</sup> als Sideramin Z bezeichnen. Sideramin Z ist ein Umwandlungsprodukt von Ferri-

<sup>3)</sup> Vgl. nachfolgende Publikation.

mycin A, das sich unter verschiedenen Bedingungen leicht bildet, wie weiter unten gezeigt wird. Es liess sich durch kurzdauernde Zonenelektrophorese in verdünnter Essigsäure leicht abtrennen<sup>8)</sup>).

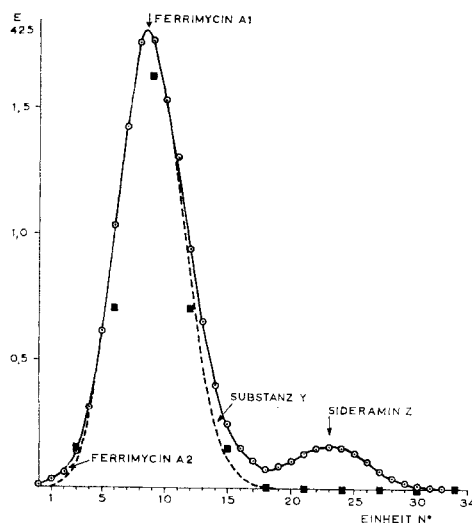


Fig. 4. Gegenstromverteilung von Ferrimycin A (650000 E/mg) über 34 Stufen im System *n*-Butanol/Benzylalkohol/0,001N HCl/ges. NaCl-Lsg. (10:5:15:3).

○—○—○ Extinktion (2 cm) bei 425 *mμ*.

■—■—■ Relative antibiotische Aktivität (*Staph. aureus*).

- - - Theoretische Verteilungskurve für  $K = 0,351$ .

In dem dabei gewonnenen Ferrimycin A von 900000 E/mg konnte neben sehr kleinen Mengen einer weiteren, bis jetzt nicht näher charakterisierten, antibiotisch inaktiven Substanz Y (vgl. Fig. 4), nur noch der antibiotische Wirkstoff nachgewiesen werden. Dieser verhielt sich bei der Papierchromatographie in einer Reihe von Systemen als einheitliche Substanz (s. z. B. Tab. 1), hingegen erfolgte in schwach essigsauren Butanol-Systemen eine Auftrennung in zwei Komponenten, die Ferrimycin A<sub>1</sub>, bzw. A<sub>2</sub> genannt wurden.

Für eine präparative Trennung durch Verteilungschromatographie an Cellulose erwies sich dieses System jedoch als wenig geeignet, da laufend Sideramin Z gebildet wurde. Sehr gute Resultate gab dann ein NaCl-haltiges tert.-Butanol-Salzsäure-System. Dabei erhielt man unter Abtrennung des antibiotisch inaktiven Stoffes Y reines Ferrimycin A<sub>1</sub> (1000000 E/mg) und in sehr kleiner Menge reines Ferrimycin A<sub>2</sub> (1100000 E/mg).

Wie aus Fig. 3 ersichtlich befand sich Ferrimycin A<sub>2</sub> bei der Ionenaustausch-Chromatographie an der Front der Aktivitätsbande c. Isolierte man diese Front separat, so konnten an A<sub>2</sub> angereicherte Präparate erhalten werden, die für die Herstellung grösserer Mengen von Ferrimycin A<sub>2</sub> geeignet waren (Fig. 5).

<sup>8)</sup> Anfänglich hatten wir Ferrimycinpräparate von 600000 E/mg aus solchen von 120000 E/mg durch langdauernde Zonenelektrophorese gewonnen (vgl. exper. Teil, S. 2114). Sie enthielten zwar kein Sideramin Z, jedoch noch die braune Substanz d, vgl. Fig. 3.

Die als Hydrochloride aus solchen Chromatogrammen in Form braunroter Pulver isolierten Ferrimycine verhalten sich bei der Gegenstromverteilung (Fig. 6), im Papierchromatogramm (Fig. 7) und bei der Elektrophorese (Fig. 8) als einheitliche Verbindungen. Sie sind in Wasser und stark polaren organischen Lösungsmitteln gut löslich.

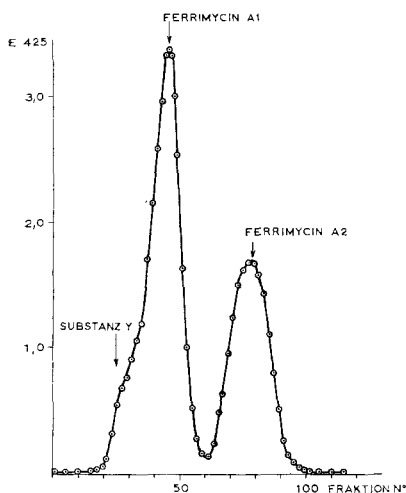


Fig. 5. Verteilungschromatographie von angereichertem Ferrimycin A<sub>2</sub>-Präparat an Cellulose.

—○—○—○— Extinktion (1 cm) bei 425 mμ.

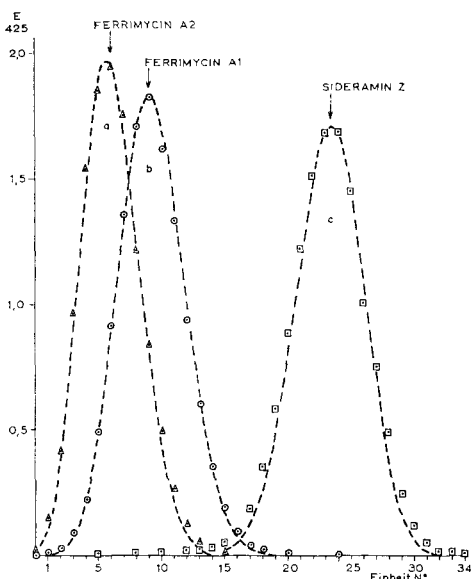


Fig. 6. Gegenstromverteilung über 34 Stufen im System *n*-Butanol/Benzylalkohol/0,001 *N* HCl/ges. NaCl-Lsg. (10:5:15:3) bei 25°.

Extinktion (2 cm) bei 425 mμ:

△△△ Ferrimycin A<sub>2</sub>; ○○○ Ferrimycin A<sub>1</sub>;  
□□□ Sideramin Z

----- Theoretische Verteilungskurven:

a für  $K = 0,175$ , b für  $K = 0,372$ , c für  $K = 2,18$

Die *Spektren* der Ferrimycine im UV.-, sichtbaren und IR.-Bereich (Fig. 9) lassen sich kaum unterscheiden. Im UV. zeigen sie Maxima bei 230 und 319 mμ, im sichtbaren Bereich die für Siderochrome<sup>9)</sup> typische flache Absorptionsbande bei 425–435 mμ. Bei beiden Ferrimycinen lassen sich durch *Titration* in 80-proz. Methylcellosolve 3 Puffergebiete im pH-Bereich von 4, 8 und 11 nachweisen. Der gut erfassbare mittlere Neutralisationsbereich ( $pK_{MCS}^*$  7,9) ergibt Äquivalentgewichte in der Größenordnung von 1100. Entsprechende Äquivalent- bzw. Molekulargewichte errechnen sich aus dem Eisen- (1 Atom) und Chlor-Gehalt (2 Atome)<sup>10)</sup>.

<sup>9)</sup> Vgl. Abb. 3, *Experientia* 16, 132 (1960).

<sup>10)</sup> Die bisherigen mikroanalytischen Ergebnisse, die an amorphen, hygroscopischen Präparaten gewonnen worden sind, lassen sich unter entsprechendem Vorbehalt für Ferrimycin A<sub>1</sub> in einer Bruttoformel C<sub>43</sub>H<sub>70</sub>O<sub>15</sub>N<sub>10</sub>Fe, 2 HCl und für Ferrimycin A<sub>2</sub> in einer Bruttoformel C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>15</sub>N<sub>10</sub>Fe, 2 HCl zusammenfassen.

Vergleich der Ferrimycine mit weiteren Siderochromen<sup>3)</sup>

- |                             |                           |
|-----------------------------|---------------------------|
| 1 Ferrimycin A <sub>1</sub> | 4 Albomycin (500000 E/mg) |
| 2 Ferrimycin A <sub>2</sub> | 5 Ferrioxamin B           |
| 3 Sideramin Z               | 6 Ferrichrom              |

Nachweis durch Eigenfarbe und Farbreaktion mit  $\text{FeCl}_3\text{--K}_3\text{Fe(CN)}_6$ -Reagens<sup>11)</sup>  
(schematische Darstellung)

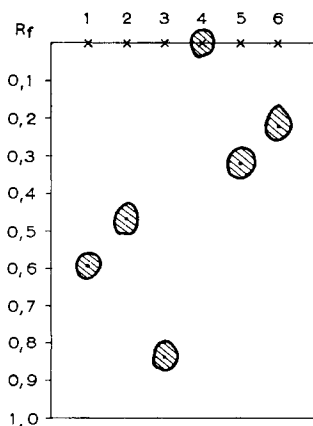


Fig. 7. Papierchromatogramm im System tert. BuOH 0.004N HCl/ges. NaCl-Lsg. (2:1:1).  
Papier imprägniert mit Aceton/H<sub>2</sub>O/ges. NaCl-Lsg. (6:3:1).

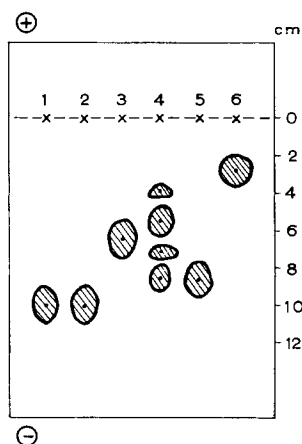


Fig. 8. Papierelektrophorese in  $\frac{1}{3}$ N Essigsäure (200 V, 2  $\frac{1}{2}$  Std.).

Die Ferrimycine zeigen reduzierende *Eigenschaften*, beispielsweise gegenüber  $\text{FeCl}_3\text{--K}_3\text{Fe(CN)}_6$ -Reagens<sup>11)</sup>. Umgekehrt werden sie durch Natriumdithionit unter Entfärbung reduziert. Diese letztere Reaktion, die durch Luftsauerstoff rückgängig gemacht wird, beruht offenbar auf der Reduktion des im Ferrimycin komplex gebundenen 3-wertigen Eisens. Der 3-wertige Zustand des Eisens ergibt sich auch aus dem Befund, dass angesäuerte Ferrimycinlösungen mit Kaliumferrocyanid – nicht aber mit Kaliumterricyanid – momentan unter Bildung von Berlinerblau reagieren. Das Eisen kann dem Komplex durch Mineralsäure oder 8-Hydroxychinolin unter Entfärbung, oder durch starke Alkalien unter Ausfällung von Eisenhydroxyd entzogen werden.

Wie bereits erwähnt, entstehen aus Ferrimycin A sehr leicht antibiotisch inaktive Abbauprodukte. So erhält man z. B. bei der Einwirkung von Natriumacetat das Sideramin Z, das nicht nur keine antibiotische Aktivität mehr besitzt, sondern in spezifischer Weise die antibiotische Aktivität von Ferrimycin hemmt. Es gehört also wirkungsmässig in die Gruppe der Sideromycin-Antagonisten, die wir zusammenfassend als Sideramine bezeichnet haben<sup>3)</sup> und zu denen auch die Ferrioxamine zu zählen sind<sup>7)</sup>. Sideramin Z, das noch nicht in völlig einheitlicher Form vorliegt (vgl. Fig. 6), zeigt im Antisideromycin-Test<sup>2)</sup> ca. 10% der Wirksamkeit von Ferrioxamin B. Die bisherigen analytischen Befunde an diesem Produkt deuten darauf hin, dass bei seiner Entstehung aus Ferrimycin ein basisches Zentrum verloren geht, wobei sich die Molekulargrösse nur unwesentlich verändert. Bei Einwirkung von

<sup>11)</sup> G. M. BARTON *et al.*, Nature 170, 249 (1952).

NaOH im Bereich von pH 7–9 entstehen aus Ferrimycin weitere, noch nicht näher charakterisierte, jedoch papierchromatographisch dem Sideramin Z ähnliche Produkte. Die Reaktionsfreudigkeit der Ferrimycins in diesem pH-Bereich dürfte zum Teil verantwortlich sein für die verhältnismässig geringe fermentative Ausbeute, sowie für die im komplizierten Anreicherungsverfahren zum Ausdruck kommenden Schwierigkeiten bei der Isolierung. Die leicht eintretende Bildung von antagonistisch wirkenden Abbauprodukten erklärt im weiteren die relativ grosse Streuung der mikrobiologischen Bestimmung, die bei der Anreicherung zusätzliche Schwierig-

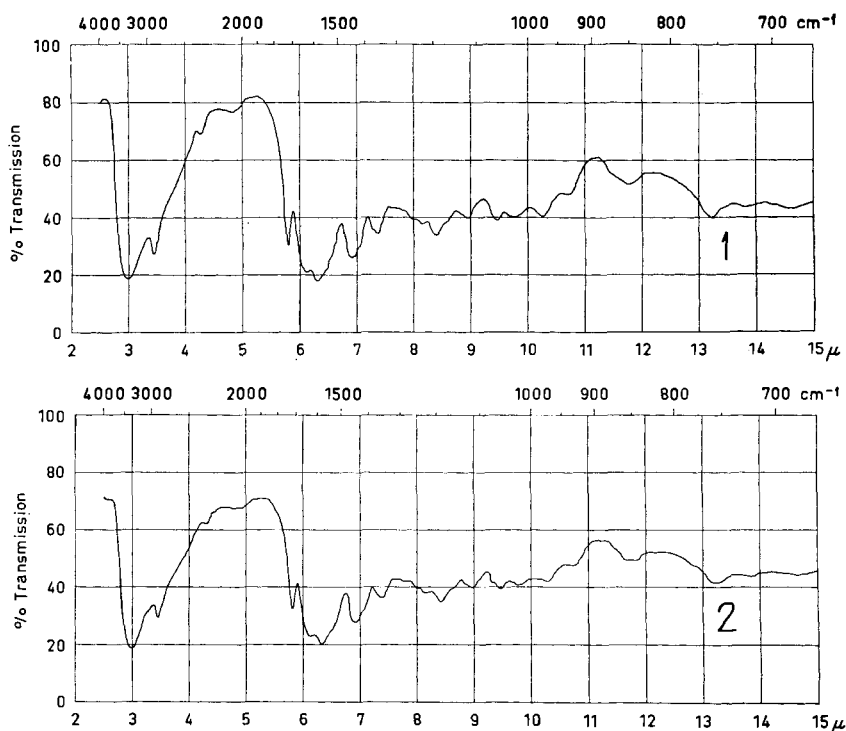


Fig. 9. IR.-Absorptionsspektren in KBr.

Kurve 1: Ferrimycin-A<sub>1</sub>-dihydrochlorid. Kurve 2: Ferrimycin-A<sub>2</sub>-dihydrochlorid.

keiten verursachte. Interessanterweise sind Ferrimycinlösungen im pH-Bereich oberhalb 8 wiederum etwas stabiler. Dies zeigt beispielsweise die in Fig. 1 aufgeführte Stabilitätskurve von reinem Ferrimycin A<sub>1</sub>. Reines Ferrimycin A<sub>2</sub> verhält sich gleich. Wässrige Lösungen der beiden reinen Ferrimycin-dihydrochloride (ohne Pufferzusatz), die an und für sich sauer reagieren, sind hingegen über Wochen ohne Aktivitätsverlust bei Raumtemperatur haltbar.

Eingehende Untersuchungen zur Konstitutionsermittlung dieser Antibiotika sind im Gange; über vorläufige Abbauergebnisse wurde bereits berichtet<sup>1)</sup>. Die biologischen Untersuchungen werden Gegenstand besonderer Mitteilungen sein<sup>12)</sup> <sup>13)</sup>.

<sup>12)</sup> E. BACHMANN & A. ZÄHNER, in Vorbereitung.

<sup>13)</sup> W. SACKMANN, P. REUSSER, L. NEIPP, F. KRADOLFER & F. GROSS, in Vorbereitung.

Wir danken den Herren Dr. L. NEIPP und Dr. W. SACKMANN für die biologischen Testierungen, Herrn Dr. W. PADOWETZ für die Ausführung der Mikroanalysen, den Herren Dr. E. GANZ und Dr. R. ZÜRCHER für die Aufnahme der IR.-Absorptionsspektren, Herrn Dr. W. SIMON für die Titrationen und Herrn Dr. H. HÜRZELER für die Mithilfe bei der Ausarbeitung von Trennverfahren,

### Experimenteller Teil<sup>14)</sup>

**1. Beschreibung des Organismus, Fermentation, Definition der antibiotischen Aktivitätseinheit.** – Der Stamm ETH 9578 wird durch die folgenden Merkmale charakterisiert<sup>15)</sup>:

1. Sporen mit kurzen, an der Basis leicht verbreiterten Stacheln. 2. Farbe des Luftmycels aschgrau (*cinereus*). 3. Sporenketten mit offenen, regelmässigen Spiralen, oft mehr als 6 Windungen. 4. Auf peptonhaltigen Nährböden wird kein melanoides Pigment gebildet. Der Stamm stimmt in allen wesentlichen Merkmalen mit *Streptomyces griseoflavus* (KRAINSKY) WAKSMAN *et* HENRICI überein, weshalb wir ihn zu dieser Art stellen.

Für die *Fermentation* wurde der Stamm ETH 9578 in Gärtankkultur bei 27° während 36–48 Std. auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: «Distillers Solubles» 20 g, Rapsschrot 20 g, Rohglucose 10 g, sek. Kaliumphosphat 0,2 g, Calciumcarbonat 10 g, dest. H<sub>2</sub>O 1000 ml, Salzlösung 10 ml. (Salzlösung: Sek. Ammoniumphosphat 20 g, Kaliumnitrat 10 g, Magnesiumsulfat 5 g, Ferricitrat 2 g, Zinksulfat 1 g, Manganchlorid 0,1 g, Cobaltchlorid 0,1 g, Kupfersulfat 0,05 g, Borsäure 0,002 g, dest. H<sub>2</sub>O 1000 ml.)

Als eine *Ferrimycineinheit* E wird jene Aktivität definiert, die in 20 ml Fleischextraktagar (9-cm-Petrischale) bei einer mittleren Einsaat von 200 Keimen von *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nach 24 Std. bei 37° 50% des Wachstums unterdrückt<sup>16)</sup>.

**2. Herstellung von Rohferrimycin durch Noritadsorption.** – 600 l antibiotisch aktives Kulturfiltrat wurden mit 5,5 kg Hyflo-Supercel verrührt, mit 2,5 l 2N Salzsäure auf pH 4,0 gestellt und filtriert. Nach Waschen des Filtrerrückstandes mit 100 l Wasser versetzte man das klare Filtrat mit 7 kg vorbehandeltem Norit und rührte während 45 min. Die Vorbehandlung des Norits erfolgte durch mehrmaliges Ausrühren mit 1N Salzsäure und anschliessendes Neutralwaschen mit Wasser. Der mit dem Antibiotikum beladene Norit wurde unter Zusatz von Filterhilfsmitteln filtriert und zweimal mit 200 l Wasser ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser enthielten keine antibiotische Aktivität. Diese konnte durch 2maliges Ausrühren (je 60 min) mit n-Butanol-Methanol-Eisessig-Wasser im Volumenverhältnis von 2:1:1:2 von der Kohle eluiert werden. Die vereinigten, braun gefärbten Eluate (140 + 46 l) wurden durch Zugabe von 96 l n-Butylacetat in 2 Phasen aufgetrennt. Nach Waschen der organischen Phase mit wenig Wasser wurden die vereinigten wässrigen Phasen (65 l), die die gesamte antibiotische Aktivität des Eluates enthielten, mit 72 l n-Butanol/n-Butylacetat (1:2), 48 l Essigester und 24 l Äther ausgerührt. Die verbleibende wässrige Phase (44 l) konzentrierte man bei höchstens 30° auf 5,45 l. Aus dem Konzentrat erhielt man das Antibiotikum durch Gefriertrocknung in Form von 509 g eines braunen, hygroskopischen Pulvers.

338 g dieses Materials wurden in 1,5 l Wasser gelöst und nach Zusatz von 150 g krist. Ammoniumsulfat mit 1 l + 2 × 500 ml Phenol-Chloroform (1 g: 1 ml) extrahiert. Die vereinigten Phenol-Chloroform-Extrakte filtrierte man, nach Waschen mit 750 ml 1N Salzsäure, durch eine Schicht von Celite und versetzte das klare, rotbraune Filtrat unter Rühren mit 600 ml Wasser, 4 l Äther und 4 l Petroläther. Die ausgeschiedene wässrige Phase wurde zur Entfernung des gelösten Phenols mit Äther gewaschen und hierauf lyophilisiert. Das dabei als braunes Pulver erhaltene Rohferrimycin (136 g) zeigte verglichen mit einer durch Lyophilisation des Kulturfiltrates gewonnenen Probe eine ca. 100fach höhere antibiotische Aktivität. Papierchromatographie und Papierelektrophorese vgl. Tab. 1.

**3. Herstellung von Rohferrimycin durch Adsorption an Amberlite IRC 50.** – 300 l Kulturlösung mit einer antibiotischen Aktivität von 3000 E/ml wurden unter Rühren mit 10-proz.

<sup>14)</sup> Die UV.-Absorptionsspektren sind mit einem CARY-Spektrographen Modell 14 M-50 gemessen; die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER Zweistrahl-Spektrographen Modell 21 aufgenommen.

<sup>15)</sup> Systematik nach L. ETTLINGER, R. CORBAZ & R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. 31, 326 (1958).

<sup>16)</sup> Die Aktivität der einzelnen Präparate wurde quantitativ im Plattentest (Vierpunkt-Verfahren) bestimmt unter Verwendung eines Standard-Präparates, dessen Aktivität (E/mg) auf diese Weise definiert worden war.



wässriger Oxalsäurelösung bis zur Erreichung von pH 4,0 versetzt und unter Zusatz von Hyflo-Supercel filtriert. Das klare Filtrat liess man mit 1,2 l/min durch eine mit 6,4 l Amberlite IRC 50 beschickte Säule (80 cm × 80 cm<sup>2</sup>) perkolieren. Das Harz war vorgängig mit Natronlauge zu  $\frac{2}{3}$  in die Natriumform übergeführt worden. Nach beendeter Adsorption wurde mit 30 l Wasser und 60 l 80-proz. Methanol gewaschen. Durchlauf und Waschflüssigkeit enthielten nur geringe antibiotische Aktivität. Die Hauptmenge der Aktivität liess sich mit insgesamt 37 l Methanol/1 N Salzsäure (4:1) eluieren. Das Eluat konzentrierte man, nach Zurückstellung des pH auf 4,5, im Zirkulationsverdampfer bei höchstens 30° auf 2 l. Das durch Filtration von wenig unlöslichem Material befreite, stark kochsalzhaltige, dunkelgefärbte Eluatkonzentrat wurde in 4 Portionen mit insgesamt 500 ml Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Nach 3maligem Waschen mit 10% Kochsalz enthaltender 0,01 N Salzsäure und nach Filtration durch eine kleine Säule von Celite versetzte man die vereinigten Phenolextrakte unter Kühlung und Rühren mit 35 g Hyflo-Supercel und gab hierauf langsam 1,5 l Äther und 1 l Petroläther zu. Das dabei erhaltene, pulverige Gemenge aus Niederschlag und Filterhilfsmittel wurde zwecks Entfernung von Phenol ausgiebig mit Äther gewaschen und hierauf mit wenig Methanol eluiert. Das tief rotbraun gefärbte Eluat lieferte beim Eindampfen im Vakuum 36 g Rohferrimycin mit 12000 E/mg als dunkelbraunes Pulver. Aktivitätsausbeute in bezug auf die Kulturlösung: ca. 60%.

**4. Anreicherung von Rohferrimycin durch Fällung und Extraktion mit Phenol.** – 30 l wässriges, kochsalzhaltiges Eluatkonzentrat, das in der eben geschilderten Weise durch Elution eines Ferrimycin-Amberlite-Adsorbates und anschliessende Entfernung des Methanols im Vakuum gewonnen worden war, versetzte man unter Rühren mit 1 kg Hyflo und innerhalb von 2 Std. mit 1,8 l einer Mischung von 11 Teilen Phenol und 1 Teil Wasser. Anschliessend liess man noch 30 min rühren, worauf abgenutscht wurde. Der gut ausgepresste Filterkuchen, der annähernd die gesamte Aktivität enthielt, wurde ausgiebig mit Äther und Aceton verrührt, jeweils abgenutscht und schliesslich auf der Nutsche mit Chloroform gewaschen. Den chloroformfeuchten Filterkuchen trug man unter Rühren in 3 l Phenol/Chloroform (1 g: 1 ml) ein, rührte 1 Std. weiter, versetzte anschliessend im Verlaufe von 1 Std. in gleichmässigem Strom mit 15 l Chloroform, filtrierte und wusch mit 2 l Phenol-Chloroform (1 g: 11 ml). Der Rückstand enthielt noch ca. 5% der eingesetzten Aktivität. Die vereinigten aktiven Filtrate (22 l) konzentrierte man bei 25° auf 4 l. Das Konzentrat wurde unter Rühren in eine Mischung von 4 l Äther, 8 l Petroläther und 400 g Hyflo-Supercel eingetroppt. Nach dem Abnutschen wusch man den Filterkuchen mit 2 l Äther und 1 l Aceton, verrührte 3mal während 10 min mit 1,5 l Methanol und filtrierte jeweils. Die vereinigten Filtrate lieferten beim schonenden Eindampfen 88 g eines rotbraunen Ferrimycinpräparates von 60000 E/mg.

Tabelle 2. *Chromatographische Auftrennung von 75 g rohem Ferrimycin an Cellulosepulver*

| Frakt.-Nr. | Menge in g | Aktive Substanz  | Wirksamkeit E/mg |
|------------|------------|------------------|------------------|
| 8–13       | 13,09      | Ferrimycin B     | 4300             |
| 14–16      | 7,54       | Ferrimycin B + A | 11000            |
| 17         | 2,73       | } Ferrimycin A   | 110000           |
| 18         | 2,91       |                  | 300000           |
| 19         | 2,60       |                  | 300000           |
| 20         | 2,14       |                  | 190000           |
| 21         | 1,77       |                  | 150000           |
| 22         | 1,70       |                  | 150000           |
| 23–26      | 5,15       |                  | 60000            |

**5. Trennung von Ferrimycin A und B:** – a) *Durch Verteilungschromatographie an Cellulose.* 75 g rohes Ferrimycin von 60000 E/mg wurden an einer Säule (140 cm × 77 cm<sup>2</sup>) von 3,4 kg Cellulosepulver (WHATMAN Standard Grade) chromatographiert, die durch Einpressen von 17 Portionen trockener Cellulose und anschliessendem 50-stdg. Durchlauf des Fließmittels vorbereitet worden war. Als Fließmittel diente die mit 10 Vol.% n-Butanol versetzte organische Phase eines Gemisches von n-Butanol/Eisessig/Wasser im Volumenverhältnis von 4:1:5. Die Substanz wurde

2 Std. mit 150 g Cellulose und 750 ml Fliessmittel verrührt und hierauf als homogener Brei auf die Säule aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms liess sich an der Eigenfarbe der Verbindungen verfolgen. Kurz vor Austritt der ersten rot gefärbten Zone begann man das Eluat in Fraktionen zu 450 ml aufzufangen und papierchromatographisch und mikrobiologisch zu testen. Zur Aufarbeitung wurden die antibiotisch aktiven Eluatfraktionen mit Petroläther geschüttelt und die dabei ausgeschiedenen, konzentrierten wässrigen Phasen, nach Waschen mit Benzol, lyophilisiert (s. Tab. 2).

b) *Durch CRAIG'sche Verteilung.* 6 g Ferrimycinpräparat von 60000 E/mg wurden bei 19° in einer pro Einheit je 100 ml obere und 100 ml untere Phase enthaltenden CRAIG'schen Apparatur im System Benzylalkohol/n-Butanol/0,02N Salzsäure/ges. wäss. NaCl-Lsg. (10:5:15:3) 115mal verteilt. Die Substanz hatte man bei Beginn der Verteilung gleichmässig in die ersten 3 Einheiten der Apparatur eingefüllt. Nach beendeter Verteilung wurden die einzelnen Fraktionen bis zur Aufarbeitung bei 0° aufgehoben. Zur analytischen Auswertung entnahm man jeder dritten Fraktion 10 ml obere und 10 ml untere Phase und schüttelte diese mit 50 ml Petroläther. Die abgetrennte wässrige Phase (10 ml), die das hydrophile Material enthielt, wurde durch kurzes Evakuieren vom noch anhaftenden organischen Lösungsmittel befreit. Die bei der Testierung dieser Lösungen erhaltenen Ergebnisse sind in Fig. 2 zusammengestellt. Kurve 1: Extinktion (1 cm) 425 m $\mu$ . Kurve 2: Extinktion (1 cm) bei 570 m $\mu$  nach Reaktion von 0,5 ml Testlösung mit 0,5 ml Ninhydrinreagens<sup>17)</sup> während 15 min bei 100° und anschliessender Verdünnung mit 5 ml Alkohol-Wasser (1:1). Kurve 3: antibiotische Aktivität der 50mal verdünnten Testlösung im Vergleich zu einem willkürlich gewählten Ferrimycinstandard. Gemäss Papierchromatographie im System I (vgl. Tab. 1) enthielten die Fraktionen Nr. 40–70 Ferrimycin A und Nr. 75–100 Ferrimycin B. Zur Aufarbeitung wurden die gruppenweise vereinigten Fraktionen mit dem gleichen Volumen Petroläther geschüttelt. Aus den wässrigen Phasen isolierte man die rotgefärbten Inhaltsstoffe in der bereits geschilderten Weise durch Phenolextraktion (Resultate s. Tab. 3).

Tabelle 3. *Auftrennung von 6 g rohem Ferrimycin durch CRAIG'sche Verteilung*

| Ferrimycin | Fraktion | Menge<br>in mg | Aktivität<br>E/mg | Anreiche-<br>rungsfaktor | Aktivitäts-<br>ausbeute % |
|------------|----------|----------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| A          | 25–39    | 492            | 30000             | 0,5                      | 4                         |
|            | 40–48    | 254            | 310000            | 3,2                      | 22                        |
|            | 49–55    | 211            | 600000            | 10                       | 35                        |
| B          | 56–70    | 257            | 220000            | 3,7                      | 16                        |
|            | 71–95    | 938            | 110000            | 1,9                      | 30                        |

**6. Anreicherung von Ferrimycin A:** – a) *Durch Gegenstromelektrophorese.* 8 g Portionen von Ferrimycin-A-Präparaten mit Aktivitäten von 120000–180000 E/mg, die man durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen erhalten hatte, wurden in 0,33N Essigsäure der Gegenstromelektrophorese unterworfen. Die dazu verwendete Apparatur ist in Fig. 10 skizziert. Sie wurde vorerst zur Hälfte mit 0,33N Essigsäure gefüllt. In das mit Kühlmantel versehene Trennrohr A von 1,2 m Länge und 6 cm Durchmesser, das am unteren Ende durch ein über den Schliff gezogenes grobporiges Nylontuch gegen das Kathodengefäss B abgegrenzt wird, goss man einen dünnen Brei von Cellulosepulver (WHATMAN Standard Grade) in 0,33N Essigsäure. Durch Sedimentation<sup>18)</sup> bildete sich eine 1 m hohe, lockere Schicht von Füllstoff, auf welche die Substanz, gelöst in 160 ml 0,33N Essigsäure, aufgetragen wurde. Nach dem Einsickernlassen der tief rot gefärbten Lösung wurde die Apparatur mit der Essigsäurelösung vollständig gefüllt und unter guter Kühlung (10–12°) bei 1000 V mit 100 mA unter Strom gesetzt. Das Antibiotikum wanderte dabei als gut erkennbare, orangerot gefärbte, sich bis auf 30 cm verbreitende Zone mit einer Geschwindigkeit von 3,3 cm/Std. gegen die Kathode. Um die Trennwirkung der Säule zu erhöhen, kompensierte man diese elektrische Bewegung durch eine entgegengesetzt gerichtete Elektrolytströmung von 81 ml/Std. und hielt dadurch die Antibiotikumzone in der Säule örtlich fest. Die konstante Elektrolytströmung wurde durch Zulauf von 0,33N Essigsäure aus dem Reservoir D

<sup>17)</sup> S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 907 (1954).

<sup>18)</sup> Vgl. auch J. PORATH, Biochim. biophysica Acta 22, 151 (1956).

und gleichzeitigem Ablauf durch das am Anodengefäß C angebrachte Nadelventil erzeugt. Inaktive, grösstenteils braungefärbte Begleitstoffe mit grösserer bzw. kleinerer elektrischen Wanderungsgeschwindigkeit als Ferrimycin A sammelten sich im Verlauf der Elektrophorese im Kathodenraum B bzw. Anodenraum C an und wurden dort alle 12 Std. durch Spülung en fernt. Nach einer Elektrophoresedauer von 5–6 Tagen hatte das Antibiotikum eine Flüssigkeitssäule von

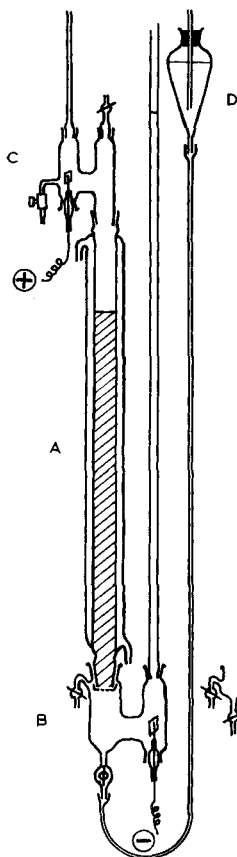


Fig. 10

4–5 m Länge durchwandert. Hierauf wurde das Kathodengefäß B durch das Schliffstück E ersetzt und die auf der Säule befindliche Substanz mit Elektrolytlösung eluiert. Die im automatischen Fraktionensammler aufgefangenen, tiefrotgefärbten, biologisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt (ca. 1,5 l) und nach Zusatz von 10% Kochsalz mit 250 ml Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Aus dem mit Celite geklärten Phenol-Chloroform-Extrakt liess sich Ferrimycin A durch Zusatz von 1 l Äther und 500 ml Petroläther auf Hyflo-Supercel als orangegefärbter Niederschlag ausfällen und nach Waschen mit Äther und Eluieren mit Methanol beim schonenden Eindampfen in Form eines braunroten Pulvers von 600 000 E/mg gewinnen. Die Ausbeute betrug, je nach Aktivität des Ausgangsmaterials, 1,4–2,1 g.

Solcherweise isolierte Präparate enthielten vorwiegend Ferrimycin-A-monohydrochlorid. Beispielsweise Präparat Nr. 100: 50,68% C, 6,99% H, 13,45% N, 3,66% Fe, 2,75% Cl (Cl/Fe-Verhältnis: 1,2). Sie verloren bei 6-monatiger Lagerung bei 20° 50% ihrer antibiotischen Aktivität unter Bildung von Sideramin Z. Wenn man hingegen die aus den kochsalzhaltigen Essigsäurelösungen gewonnenen Phenol-Chloroform-Extrakte, vorgängig der Fällung mit Äther-Petroläther, mit 10% Kochsalz enthaltender 0,01N Salzsäure mehrmals wusch, so erhielt man das Ferrimycin A in Form des beständigen Dihydrochlorids. Beispielsweise Präparat Nr. 107: 50,4% C, 7,2% H, 3,29% Fe, 4,81% Cl (Cl/Fe-Verhältnis: 2,3).

b) *Durch Chromatographie am Ionenaustauscher.* 2 g durch CRAIG'sche Verteilung gewonnenes Ferrimycin A (310 000 E/mg) wurden an einer Säule (70 cm × 7,14 cm<sup>2</sup>) von Dowex 50 WX<sub>2</sub> (100/200 mesh) bei 17° chromatographiert. Das Harz war vorgängig nach Vorschrift von HIRS *et al.*<sup>19)</sup> gereinigt und nach Überführung in die Ammoniumform während 3 Tagen auf der Säule mit 0,2M Ammoniumacetatpuffer von pH 4,50 bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 100 ml/Std. äquilibriert worden. Die in 20 ml Puffer gelöste Substanz brachte man vorsichtig auf die Säule und entwickelte anschliessend mit derselben Pufferlösung und Durchlaufgeschwindigkeit, wobei das Eluat in Fraktionen zu 40 ml aufgefangen wurde. Nach 20-stdg. Entwicklungsdauer (Fraktion Nr. 48) wurde auf Gradient-Elution umgestellt, indem

man die in die Säule eintretende Pufferlösung in einer 1 l Mischkammer durch Zufluss einer 2M Ammoniumacetat-Pufferlösung (pH 4,50) kontinuierlich aufkonzentrierte. Die Eluatfraktionen wurden durch Extinktionsmessung bei 425 mμ und biologische Testierung ausgewertet (vgl. Fig. 3).

Die gemäss dieser Auswertung zusammengefassten Fraktionen (90–100), (115–145) und (195–216) isolierte man in der bereits beschriebenen Weise mit Phenol/Chloroform (1:1), NaCl-haltiger Salzsäure, Äther/Petroläther, Hyflo Supercel und Methanol. Ein Teil des eingesetzten Materials war als braun gefärbte Zone (d) an der Auftragsstelle verblieben und wurde verworfen. Aus Fraktion (90–100) erhielt man 16 mg Ferrioxamin B<sup>7)</sup> (Rf in System V<sup>20)</sup>: 0,32; vgl. auch

<sup>19)</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 219, 623 (1956).

<sup>20)</sup> System V: tert. Butanol/0,004N HCl/ges. NaCl-Lsg. (2:1:1). WHATMAN-Papier Nr. 1, imprägniert mit Aceton/H<sub>2</sub>O/ges. NaCl-Lsg. (6:3:1).

Fig. 7). Fraktion (115–145) ergab 135 mg einer violettrot gefärbten Substanz mit Maxima bei 255 und 510–530  $m\mu$ , die im Test mit *Lactobacillus leichmannii* Vitamin-B<sub>12</sub>-Wirksamkeit zeigte<sup>21)</sup>.

Fraktion (195–216) lieferte 440 mg Ferrimycin A mit einer Aktivität von 650 000 E/mg. Mikroanalyse nach 48stdg. Trocknen bei 20°/0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH: C 48,65%, H 7,09%, N 12,95%, Fe 4,56%, Cl 6,10%, (C)CH<sub>3</sub> 1,99% (ROTH-KUHN), (Amino)-N 2,33% (VAN SLYKE). Titration:  $pK_{MCS}^{*22)}$ : 4,18; 7,88 (Äqu. Gew.: 1106). UV.-Spektrum:  $\lambda_{max}$ : 228; 319; 425  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 282$ ; 28,2; 22,6). Papierchromatographie im System V<sup>20)</sup> mit 50  $\mu$ g, Nachweis durch blaue Farbreaktion mit FeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-Reagens<sup>11)</sup>: Hauptbestandteil (ca. 80%) Ferrimycin A<sub>1</sub> (Rf: 0,59), Nebenkomponten: Ferrimycin A<sub>2</sub> (Rf: 0,47), Sideramin Z (Rf: 0,84) und spurenweise Substanz Y (Rf: 0,76). CRAIG'sche Verteilung im System VI<sup>23)</sup>: 30 mg wurden bei 25° über 34 Stufen zu je 3 ml oberer und 3 ml unterer Phase verteilt, der Inhalt der Einheiten wurde nach beendeter Verteilung mit Methanol auf 10,0 ml verdünnt und die Extinktion (2 cm) bei 425  $m\mu$  gemessen (vgl. Fig. 4).

Ferrimycin A wird von alkalischem Kaliumferricyamid oxydiert: Reduktionsäquivalent nach HANES<sup>24)</sup>: 1,7 ml 0,01N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/mg.

**7. Abtrennung von Sideramin Z durch Elektrophorese: Ferrimycin A mit 900 000 E/mg.** – 4 g Ferrimycin A (700 000 E/mg) wurden in 0,33N Essigsäure unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Apparatur der Zonenelektrophorese unterworfen (ohne Gegenstrom). Nach 21 Std. bei 100 mA, 1000 V, befand sich Ferrimycin A in einer 35 cm breiten Zone mit 74 cm Frontabstand vom Startpunkt entfernt. Elution mit Essigsäure und übliche Aufarbeitung ergaben 3,21 g Ferrimycin A von 900 000 E/mg und 280 mg Sideramin Z.

**8. Ferrimycin A<sub>1</sub>.** – 400 mg Ferrimycin A von 900 000 E/mg wurden an einer mit 830 g WHATMAN Cellulosepulver trocken gestopften Säule (87 cm  $\times$  23,8 cm<sup>2</sup>) chromatographiert. Zur Vorbereitung des Chromatogramms wurden vorerst im Verlauf von 70 Std. 5,3 l Methanol/Wasser/gesätt. wäss. NaCl-Lsg.-(5:2:3)-Gemisch und anschliessend innerhalb 70 Std. 3 l der organischen Phase eines Gemisches von tert. Butanol/0,02N HCl/ges. NaCl-Lsg. (2:1:1) durch die Säule durchlaufen gelassen. Anschliessend äquilibrierte man die Säule während 6 Tagen bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 30 ml/Std. mit der als Fließmittel dienenden organischen Phase eines Gemisches von tert. Butanol/0,001N HCl/gesätt. wäss. NaCl-Lsg. (2:1:1). Die Substanz vertrieb man im Mörtel mit 5 g gewaschenem Cellulosepulver und 30 ml Fließmittel zu einem homogenen Brei, den man auf die Säule auftrug. Im Verlauf des Chromatogramms (75 Std.) entwickelten sich 3 gefärbte Zonen. Kurz vor Austritt der ersten Zone begann man das Eluat in Fraktionen zu 10 ml im automatischen Fraktionensammler aufzufangen. Vorzone: Frakt.-Nr. 20–37; Hauptzone: Frakt.-Nr. 38–65; Nachzone: Frakt.-Nr. 75–95. Die vereinigten Eluatfraktionen wurden mit 10 Vol. % Wasser und dem gleichen Volumen Äther geschüttelt. Aus der wässrigen Phase isolierte man die rotgefärbten Stoffe in der üblichen Weise unter Verwendung von Phenol/Chloroform (1:1), NaCl-haltiger Salzsäure, Äther/Petroläther, Hyflo-Supercel und Methanol: Aus Fraktion (20–37) 37 mg eines Gemisches von Substanz Y (Rf in V<sup>20)</sup>: 0,76) und Ferrimycin A<sub>1</sub> (Rf in V: 0,59), aus Fraktion (75–95) 5 mg reines Ferrimycin A<sub>2</sub> (Rf in V: 0,47).

Die Hauptfraktion (38–65), die gemäss Papierchromatographie (Rf in V: 0,59) reines *Ferrimycin A<sub>1</sub>* enthielt, wurde in 2 Portionen aufgearbeitet: (38–49): 139 mg Präparat Nr. 132; (50–65): 152 mg Präparat Nr. 133. Die analytischen Daten<sup>10)</sup> dieser amorphen, hygroscopischen Präparate sowie jene eines weiteren, entsprechend gewonnenen Ferrimycin-A<sub>1</sub>-dihydrochlorids (Nr. 134) erhielt man nach 50 Std. Trocknen bei 25°/0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH.

| Gef.             | C     | H    | N     | Fe   | Cl   | (C)CH <sub>3</sub> |
|------------------|-------|------|-------|------|------|--------------------|
| Präparat Nr. 132 | 46,70 | 6,79 | 12,73 | 5,27 | 6,43 | 1,95%              |
| Präparat Nr. 133 | 46,44 | 6,77 | 12,80 | 5,34 | 6,31 | 2,15%              |
| Präparat Nr. 134 | 48,00 | 6,88 | 12,58 | 5,33 | 6,15 | 2,11%              |

Titration<sup>22)</sup>:  $pK_{MCS}^{*}$ : a) 4,11; b) 7,92 (Äquiv.-Gew.: 1129); c) 11,4 geschätzt. UV.-Spektrum in H<sub>2</sub>O:  $\lambda_{max}$ : 229; 319; 430  $m\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%} = 317$ ; 28,3; 26,4). IR.-Absorptionsspektrum (Präp.

<sup>21)</sup> Wir danken Herrn Dr. SACKMANN für diese Bestimmungen.

<sup>22)</sup> Titrationsbedingungen: vgl. W. SIMON *et al.*, Helv. 37, 1872 (1954).

<sup>23)</sup> System VI: n-Butanol/Benzylalkohol/0,001N HCl/ges. wäss. NaCl-Lsg. (10:5:15:3).

<sup>24)</sup> C. S. HANES, Biochem. J. 23, 99 (1929).

Nr. 132) vgl. Fig. 9. Verteilungskoeffizient in System VI<sup>23</sup>):  $K = 0,372$ , ermittelt durch Verteilung von 25 mg über 34 Stufen zu je 3 ml organischer und 3 ml wässriger Phase bei 25° und Extinktionsmessung (2 cm) bei 425 m $\mu$  nach Verdünnen auf 10 ml mit Alkohol; vgl. Fig. 6. Antibiotische Aktivität:  $1\,000\,000 \pm 100\,000$  E/mg. Papier-Chromatographie und -Elektrophorese vgl. Fig. 7 und 8.

**9. Ferrimycin A<sub>2</sub>.** – 600 mg Ferrimycin A von 690 000 E/mg, das man aus den ersten Fraktionen der Zone C (vgl. Fig. 3) eines Ionenaustauschchromatogramms erhalten hatte und das Ferrimycin A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> in vergleichbarer Menge enthielt, wurden vorerst einer 21-stdg. Zonen-elektrophorese in 0,33N Essigsäure unterworfen, wobei man, unter Abtrennung von Sideramin Z, 429 mg Ferrimycin A (900 000 E/mg) erhielt (vgl. Abschnitt 7). 420 mg dieses Materials wurden unter den im voranstehenden Versuch beschriebenen Bedingungen an Cellulose chromatographiert. Man verwendete die gleiche Säule nach 5-tägigem Waschen mit Fließmittel. Die bei 425 m $\mu$  gemessenen Extinktionswerte (1 cm) der dabei erhaltenen 10 ml-Eluatfraktionen sind in Fig. 5 wiedergegeben. Aus Fraktion (20–36) erhielt man nach der üblichen Aufarbeitung 48 mg eines Gemisches von Substanz Y (Rf: 0,76, System V<sup>20</sup>) und Ferrimycin A<sub>1</sub>, aus (37–55) 187 mg reines Ferrimycin-A<sub>1</sub>-dihydrochlorid und aus (65–91) 127 mg reines *Ferrimycin-A<sub>2</sub>-dihydrochlorid* in Form braunroter, amorpher und hygroskopischer Pulver.

Ferrimycin A<sub>2</sub>-dihydrochlorid wurde zur Analyse<sup>10</sup>) 50 Std. bei 25°/0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH getrocknet. Gef.: C 45,78, H 6,77, N 12,75, (C)CH<sub>3</sub> 2,16, Cl 6,23, Fe 5,29%. UV.-Spektrum in H<sub>2</sub>O:  $\lambda_{\max}$  231 ; 319; 435 m $\mu$  ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 328; 30; 26,2$ ). IR.-Absorptionsspektrum vgl. Fig. 9. Titration<sup>22</sup>): pK<sub>MCS</sub><sup>\*</sup>: a) 4,04, b) 7,91 (Äquiv.-Gew. 1086), c) 11,5 geschätzt. Verteilungskoeffizient in System VI<sup>23</sup>):  $K = 0,175$  (vgl. Fig. 6); Papier-Chromatographie und -Elektrophorese vgl. Fig. 7 und 8. Antibiotische Aktivität:  $1\,100\,000 \pm 100\,000$  E/mg.

**10. Allgemeine Eigenschaften der Ferrimycine.** – Die Ferrimycin-dihydrochloride sind sehr gut löslich in Wasser, Methanol, 90-proz. Phenol, Phenol-Chloroform-Gemischen, Dimethylformamid und Methylcellosolve, löslich bis mässig löslich in Eisessig, Alkohol, Benzylalkohol und Pyridin, und unlöslich in Butanol, Chloroform, Essigester und weniger polaren Lösungsmitteln. Sie werden aus wässrigen Lösungen mit Pikrinsäure, Ammoniumreineckat und Pikrolonsäure in Form amorpher Salze gefällt. Mit Ninhydrin entsteht bei längerem Erhitzen in Pyridinhaltigem Butanol eine blauviolette Färbung. Die Farbreaktionen nach SAKAGUCHI und MOLISCH sowie der Anthrontest verlaufen negativ. Neutrale Lösungen der Ferrimycine reagieren nicht mit Kaliumferrocyanid, dagegen schwach angesäuerte momentan unter Bildung von Berlinerblau. Berlinerblaufärbungen entstehen auch mit Ferricyanid-FeCl<sub>3</sub>-Reagens<sup>11</sup>), während Zusatz von Kaliumferricyanid allein keine merkliche Farbreaktion und Zusatz von FeCl<sub>3</sub> allein eine Braunfärbung bewirkt. Rotgefärbte Ferrimycinlösungen verändern ihre Farbe beim Zutropfen von starker Mineralsäure reversibel über violettrot nach farblos. Beim Zusatz von 2N Natronlauge wird Eisenhydroxyd ausgefällt. Lässt man konzentrierte methanolische Lösungen von 8-Hydroxychinolin auf wässrige Lösungen der Ferrimycine einwirken, so scheiden sich rasch dunkel gefärbte, kristalline Niederschläge von Eisen-hydroxychinolin ab. Die Mutterlaugen liefern nach Waschen mit Chloroform beim Eindampfen die eisenfreien Ferrimycine in Form annähernd farbloser Pulver, die auf Zusatz von Ferrichlorid in die rotgefärbten Ferrimycine zurückverwandelt werden. Die Ferrimycine reagieren mit Natriumdithionit unter Entfärbung. Beim Stehenlassen der Lösung an der Luft kehrt die ursprüngliche Farbe wiederum zurück.

**11. Sideramin Z aus Ferrimycin A.** – 3 g Ferrimycin A von 630 000 E/mg wurden in 100 ml Wasser gelöst und durch 100 ml Amberlite IRA 400 in der Acetat-Ionen-Form durchfiltriert. Aus dem mit Essigsäure angesäuerten und mit 2% Natriumacetat versetzten Filtrat erhielt man nach der Aufarbeitung mit Phenol/Chloroform (1:1), Äther/Petroläther und Methanol 2,8 g chlor-ionen-freies Ferrimycin A mit 530 000 E/mg. Davon wurden 2 g an 816 g Cellulose (96 cm  $\times$  22 cm<sup>2</sup>) mit der organischen Phase eines Gemisches von n-Butanol/0,5N Essigsäure (1:1) chromatographiert. Auf der Säule entwickelte sich eine intensiv orangegefärbte, schnell wandernde enge Zone und eine langsamer wandernde, weniger intensiv gefärbte breite Zone. Die Spitzenfraktionen der ersten Zone (Eluatfraktionen Nr. 40–55, je 40 ml) enthielten papierchromatographisch einheitliches Sideramin Z, während die zweite Bande vorwiegend aus einem Gemisch von Ferrimycin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und Sideramin Z bestand. Die Fraktionen 40–55 wurden vereinigt mit 10 Vol.% Wasser und 1 Volumenteil Petroläther geschüttelt. Aus der mit 10% Kochsalz versetzten und mit HCl

angesäuerten wässrigen Phase isolierte man 459 mg Sideramin Z in der vorstehend beschriebenen Weise unter Verwendung von Phenol/Chloroform, NaCl-haltiger Salzsäure, Äther/Petroläther, Hyflo-Supercel und Methanol als braunrotes Pulver, das zur Analyse 70 Std. bei 20°/0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH getrocknet wurde: Gef. C 49,26, H 6,76, N 13,36, Cl 2,89, (C)CH<sub>3</sub> 2,92, Fe 5,16%. UV.-Spektrum in H<sub>2</sub>O:  $\lambda_{\max}$ : 228; 318; 430 m $\mu$  ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 329; 35; 27,2$ ). Titration<sup>22)</sup>: pK<sub>MSC</sub><sup>\*</sup>: a) 9,80 (Äquiv.-Gew.: 952), b) 11,45 (geschätzt). Verteilungskoeffizient im System VI<sup>23)</sup>:  $K = 2,18$  (vgl. Fig. 6). Papier-chromatographie und -Elektrophorese vgl. Fig. 7 und 8.

Sideramin Z entstand auch in annähernd quantitativer Ausbeute bei 48 stdg. Stehenlassen von Ferrimycin A in 2N Natriumacetat bei 25°.

#### SUMMARY

The iron containing antibiotics Ferrimycin A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> have been isolated from culture fluids of a strain of *Streptomyces griseoflavus*. Their physical and chemical properties are described.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung, und  
Institut für spezielle Botanik  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 260. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

26. Mitteilung<sup>1)</sup>)

### Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrioxamine A—F, neuer Wuchsstoffe der Sideramin-Gruppe

von H. Bickel, R. Bosshardt, E. Gäumann, P. Reusser, E. Vischer,  
W. Voser, A. Wettstein und H. Zähler

(6. X. 60)

In einer vor kurzem erschienenen zusammenfassenden Darstellung<sup>2)</sup> haben wir über Vorkommen, Bedeutung und über einige Eigenschaften der Sideramine berichtet. Unter dieser Bezeichnung wurden eisenhaltige oder eisenkomplexbildende Naturstoffe zusammengefasst, die in enger biologischer<sup>3)</sup> und chemischer<sup>1) 4)</sup> Beziehung zu den Sideromycinen, einer Gruppe eisenhaltiger Antibiotika, stehen. Die Sideramine besitzen für eine Reihe von Mikroorganismen eine ausgesprochene Wuchsstoffwirkung, die durch die Sideromycine aufgehoben werden kann. Umgekehrt lässt sich die antibiotische Wirksamkeit der Sideromycine gegenüber GRAM-positiven Bakterien durch die Sideramine hemmen. Auf diesem Antagonismus beruhen mikrobiologische Tests, die es erlauben, die Sideramine selbst in hoher Verdünnung zu erkennen und ihre Anreicherung zu verfolgen<sup>3)</sup>. Diese Wuchsstoffe

<sup>1)</sup> 25. Mitt.: Helv. 43, 2105 (1960).

<sup>2)</sup> H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Experientia 16, 129 (1960).

<sup>3)</sup> H. ZÄHNER, R. HÜTTER & E. BACHMANN, Arch. Mikrobiol. 36, 325 (1960).

<sup>4)</sup> H. BICKEL, B. FECHTIG, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & E. VISCHER, Helv. 43, 901 (1960).