

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  $P_2O_5$ /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).

scheinen in niederen Pflanzen weit verbreitet vorzukommen<sup>2) 5)</sup>. Die von uns unter den Stoffwechselprodukten einer grösseren Anzahl von Actinomyceten nachgewiesenen neuen Sideramine haben wir als Ferrioxamine bezeichnet. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Isolierung und Charakterisierung jener Ferrioxamine, die von einem der Art *Streptomyces pilosus* ETLINGER *et al.* zuzurechnenden Stamm ETH 21748 gebildet werden.

Entsprechend ihrer chemischen Verwandtschaft mit den Ferrimycinen liessen sich die Ferrioxamine mit den für diese Antibiotika ausgearbeiteten Methoden<sup>1)</sup> isolieren. Dabei konnte das Verfahren, speziell wegen der vergleichsweise grösseren Stabilität der Ferrioxamine, vereinfacht werden. Kulturen des Stammes ETH 21748 lieferten nach Zusatz von Ferrisulfat, Filtration und erschöpfender Extraktion mit Phenol-Chloroform ein Rohprodukt, das die gesamte Sideraminaktivität enthielt. Es liess sich durch CRAIG'sche Verteilung in 4 aktive Hauptfraktionen II–V zerlegen (Fig. 4), aus denen die einzelnen Ferrioxamine bei der anschliessenden Chromatographie an Dowex 50 in reiner oder stark angereicherter Form erhalten wurden. Wir bezeichnen sie als Ferrioxamin A, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E und F. Eine Übersicht über ihr papierchromatographisches und elektrophoretisches Verhalten geben die Figuren 1 und 2.

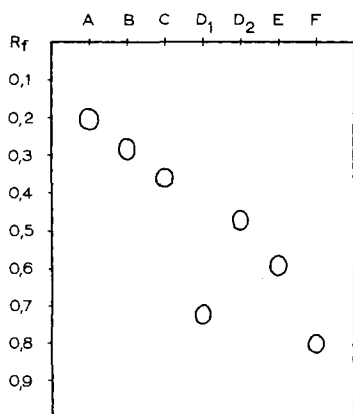


Fig. 1. Papierchromatographie der Ferrioxamine A–F im System tert. Butanol/0,004 N HCl/gesätt. wäss. NaCl-Lsg. (2:1:1), WHATMAN-Papier Nr. 1, imprägniert mit Aceton/H<sub>2</sub>O/ges. NaCl-Lsg. (6:3:1). (Schematische Darstellung)

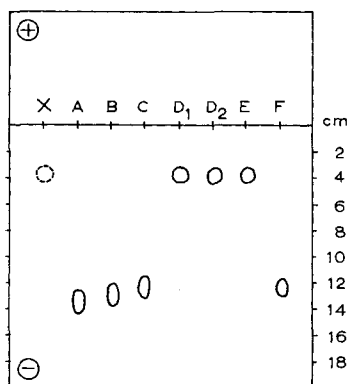


Fig. 2. Papierelektrophorese der Ferrioxamine A–F in 0,33 N Essigsäure während 4 1/2 Std. bei 220 V. X = Fructose als neutrale Vergleichssubstanz. (Schematische Darstellung)

Das aus der Verteilungsfraction III isolierte *Ferrioxamin B* ist die Hauptkomponente des vom Stamm ETH 21748 produzierten Sideramingemisches. Sein Hydrochlorid, das in Form eines braunroten Pulvers erhalten wurde, ist löslich in Wasser und stark polaren organischen Lösungsmitteln. Es verhält sich papierchromatographisch und in der CRAIG'schen Verteilung als einheitliche Substanz von ähnlicher Polarität wie die Ferrimycine A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub><sup>1)</sup>, und wandert bei der Elektrophorese in

<sup>5)</sup> J. B. NEILANDS, Bacteriol. Rev. 21, 101 (1957).

schwach essigsaurer Lösung nur wenig langsamer als jene. Ferrioxamin B zeigt im UV. Endabsorption gegen  $220\text{ m}\mu$  und im sichtbaren Bereich die für Siderochrome typische Eisenkomplex-Bande bei  $430\text{--}440\text{ m}\mu^2$ ).

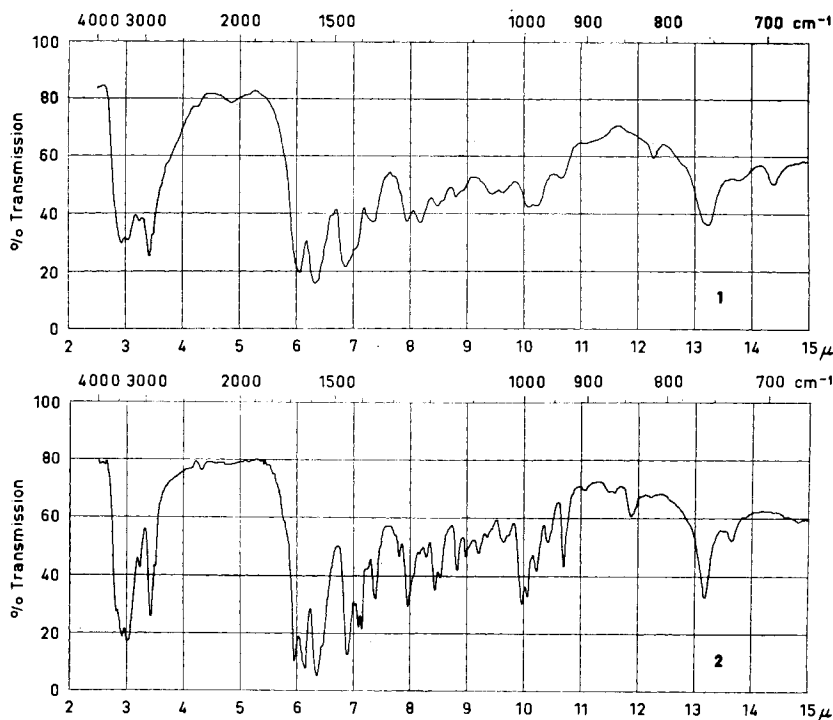


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektren in KBr.

Kurve 1: Ferrioxamin-B-hydrochlorid. Kurve 2: Ferrioxamin E

Im wenig differenzierten IR.-Spektrum (Fig. 3) lassen sich im  $3\mu$ -Gebiet  $\nu(\text{NH})$ -Banden für Aminogruppen und im  $6\mu$ -Gebiet die für Amidgruppen typischen  $\nu(\text{CO})$ -Banden erkennen. Gemäss Titration<sup>6)</sup> handelt es sich beim Ferrioxamin-B-hydrochlorid um das Salz einer einsäurigen Base von  $\text{pK}_{\text{MCS}}^* 9,74$ , mit einem Äquivalentgewicht um 700. Ähnliche Äquivalentgewichte errechnen sich aus Chlor- und Eisen-Gehalt.

Die aus den Verteilungsfractionen II und IV in kleinen Mengen isolierten *Ferrioxamine A und C* verhalten sich physikalisch-chemisch sehr ähnlich wie die Hauptkomponente B. A ist im Papierchromatogramm und in der CRAIG'schen Verteilung ein wenig polarer als B; Substanz C verhält sich umgekehrt. Diesem Befund entspricht auch die im Vergleich zu B schwach erhöhte Basizität von A, sowie seine etwas grössere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit in schwach essigsaurer Lösung, bzw. die im Vergleich zu B kleinere Basizität und elektrische Beweglichkeit von C. A und C zeigen weiterhin ähnliche Spektren und Löslichkeitseigenschaften wie Ferrioxamin B und konnten wie dieses als Hydrochloride bis anhin nur in amorpher Form erhalten werden.

<sup>6)</sup> W. SIMON *et al.*, Helv. 37, 1872 (1954).

Die Ionenaustausch-Chromatographie der Verteilungsfraktion V lieferte die lipophileren Ferrioxamine D, E und F. Das zuerst einheitlich erscheinende D liess sich durch einfache Verteilungsoperationen in zwei aktive Komponenten,  $D_1$  und  $D_2$ , auftrennen. *Ferrioxamin*  $D_1$  kristallisierte aus Methanol-Äther in länglichen, dunkel-roten Prismen, während das nur in sehr geringer Menge anfallende *Ferrioxamin*  $D_2$  noch nicht einheitlich vorliegt. Die Spektren von *Ferrioxamin*  $D_1$  gleichen wiederum jenen von B. Dagegen fällt *Ferrioxamin* E, das in mikrokristalliner Form erhalten wurde, durch sein bedeutend differenzierteres IR.-Spektrum (Fig. 3) auf. Es unterscheidet sich auch durch seine schlechte Löslichkeit in Wasser und Methanol von allen übrigen Ferrioxaminen. Das ebenfalls lipophile *Ferrioxamin* F weist im Gegensatz zu  $D_1$ ,  $D_2$  und E wiederum basischen Charakter auf und ist bezüglich pK-Wert und Verhalten bei der Elektrophorese (Fig. 2) mit den hydrophileren A, B und C vergleichbar.

In der Tabelle 1 sind charakteristische physikalische Daten der bisher isolierten Ferrioxamine übersichtshalber zusammengestellt.

Die Ferrioxamine lassen sich bei der Papier-Chromatographie und -Elektrophorese als orangerot gefärbte Flecke gut erkennen. Sie geben blaue Farbreaktionen mit  $\text{FeCl}_3$ - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Reagens<sup>7)</sup> und nach REINDEL-HOPPE<sup>8)</sup>. Die basischen Ferrioxamine A, B, C und F reagieren auch mit Ninhydrin unter Blaufärbung.

Tabelle 1. *Physikalische Daten der isolierten Ferrioxamine*

Ferrioxamin	Papier-elektrophorese <sup>a)</sup>	Papier-chromatographie		CRAIG'sche Verteilung	Extinktion bei 430 m $\mu$	Titration <sup>6)</sup>	
		Rf I <sup>b)</sup>	Rf V <sup>c)</sup>	K VI <sup>d)</sup>	$E_{1\text{ cm}}^{1\% \text{ e)}$	pK <sub>MCS</sub> <sup>*</sup>	Äquiv.-Gew.
A	9,7	0,35	0,21	0,11	37	9,89	634
B	9,1	0,44	0,29	0,23	39	9,74	704
C	8,4	0,54	0,37	0,49	39	8,88	762
$D_1$	0	0,73	0,72	1,80	44	—	—
$D_2$	0	0,64	0,48				
E	0	0,68	0,59	1,59	42	—	—
F	8,6	0,63	0,80	3,12	34	9,75	695

a) cm Laufstrecke in 0,33 N Essigsäure nach 4 $\frac{1}{2}$  Std. bei 220 V. Bezugspunkt: Fructose. Vgl. Fig. 2.  
b) Rf-Wert im System I: n-Butanol-Eisessig- $\text{H}_2\text{O}$  (4:1:5).  
c) Rf-Wert im System V: tert.-Butanol/0,004 N HCl/gesätt. wäss. NaCl-Lsg. (2:1:1); WHATMAN, Papier Nr. 1, imprägniert mit Aceton/ $\text{H}_2\text{O}$ /gesätt. wäss. NaCl-Lsg. (6:3:1).  
d) Verteilungskoeffizient im System VI: n-Butanol/Benzylalkohol/0,001 N HCl/gesätt. wäss. NaCl-Lsg. (10:5:15:3).  
e) in  $\text{H}_2\text{O}$ .

Über vorläufige chemische Untersuchungen an Ferrioxamin B ist bereits berichtet worden<sup>2) 4)</sup>. Die Konstitutionsermittlung dieses Naturproduktes wird in der nachfolgenden Mitteilung beschrieben<sup>9)</sup>.

<sup>7)</sup> G. M. BARTON *et al.*, Nature 170, 249 (1952).

<sup>8)</sup> F. REINDEL & W. HOPPE, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).

<sup>9)</sup> H. BICKEL *et al.*, Helv. 43, 2129 (1960).

Die Mikro-Analysen verdanken wir den Herren Dr. W. PADOWETZ und W. MANSER, die IR.-Absorptionsspektren den Herren Drs. E. GANZ und R. ZÜRCHER und die Titrations Herrn Dr. W. SIMON.

### Experimenteller Teil<sup>10)</sup>

**1. Beschreibung und Züchtung des Organismus. Antisideromycin-Test.** – Der *Streptomyces*-Stamm ETH 21748 wurde aus einer Bodenprobe von Mendoza, Argentinien isoliert. Er ist durch folgende Merkmale charakterisiert<sup>11)</sup>. 1. Sporen mit feinen zerbrechlichen Haaren. 2. Farbe des Luftmycels aschgrau (*cinereus*). 3. Sporenketten mit offenen, regelmässigen Spiralen, mit mehr als 6 Windungen. 4. Melanoide Verfärbung peptonhaltiger Nährböden. – Der Stamm ETH 21748 stimmt in allen Merkmalen mit dem ebenfalls Ferrioxamine bildenden Typusstamm (ETH 11686) von *Streptomyces pilosus* ETTLINGER *et al.* überein, weshalb wir ihn zu dieser Art stellen.

**Züchtung.** Für die Herstellung der Ferrioxamine wurde der Stamm ETH 21748 in Gärtankkultur bei 27° während 4–10 Tagen auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: Mannit 20 g, Sojamehl 20 g, dest. H<sub>2</sub>O 1000 ml.

Die mikrobiologische Bestimmung der Ferrioxamine erfolgte in der bereits beschriebenen Weise<sup>2,3)</sup> durch den Antagonismustest mit Ferrimycin auf Testplatten mit *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus* (modifizierter BONIFAS-Test).

**2. Isolierung von Rohferrioxamin.** – 20 l Kulturlösung wurden unter Rühren mit 400 g Hyflo-Supercel und 200 ml einer 10-proz. wässrigen Ferrisulfatlösung versetzt und filtriert. Das Filtrat extrahierte man nach Zugabe von 3,6 kg Kochsalz in einem Luwesta-Extraktor mit

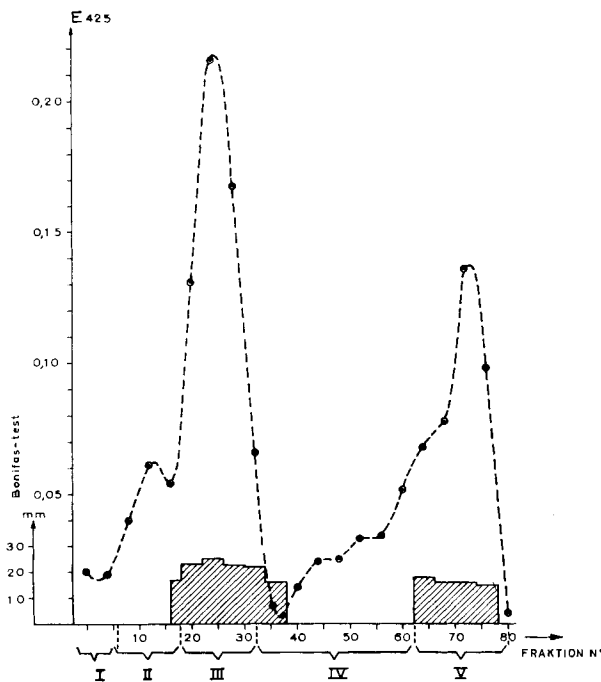


Fig. 4. Gegenstromverteilung von Rohferrioxamin

●-●- Extinktion bei 425 mμ. Antisideromycin-Wirksamkeit in mm BONIFAS-Test

<sup>10)</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>11)</sup> Systematik nach L. ETTLINGER, R. CORBAZ & R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. 31, 326 (1958).

2 l Phenol/Chloroform (1 g : 1 ml), trocknete den Extrakt über Natriumsulfat und liess ihn innerhalb 1 Std. in eine gut gerührte Suspension von 200 g Hyflo-Supercel in 2 l Äther und 10 l Petroläther einlaufen. Nach dem Filtrieren des pulverigen Gemenges aus Filterhilfsmittel und Niederschlag und Auswaschen mit ca. 2 l Äther wurde 5mal mit je 600 ml Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate lieferten beim schonenden Eindampfen 10 g rohes Ferrioxamin in Form eines braunroten Pulvers.

**3. CRAIG'sche Verteilung von Rohferrioxamin.** – 4 g rohes Ferrioxamin wurden im System n-Butanol/Benzylalkohol/0,02N HCl/ges. wäss. NaCl-Lsg. (5:10:15:3) über 80 Stufen zu je 100 ml organischer und 100 ml wässriger Phase verteilt. Die Auswertung der Verteilung erfolgte durch mikrobiologische Testierung und durch Extinktionsmessung bei 425 m $\mu$ : jeder 4. Einheit entnahm man 2 ml obere und untere Phase und vermischte diese mit 32 ml Methanol, wobei eine homogene Lösung erhalten wurde, deren Konzentration für beide Testierungen geeignet war (Fig. 4). Die gemäss dieser Auswertung in 5 Gruppen (I–V) zusammengefassten Verteilungsfractionen enthielten, wie sich papierchromatographisch zeigen liess, neben dem Hauptprodukt Ferrioxamin B (in Verteilungsfraction III) weitere antisideromycin-wirksame, rotgefärbte und mit FeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-Reagens<sup>7)</sup> unter Blaufärbung reagierende Verbindungen.

Fraktion No.	Sammelfraktion	hauptsächlichstes Ferrioxamin
0–5	I	—
6–18	II	A
19–32	III	B
33–62	IV	C
63–80	V	D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> , E und F

Die Verteilungsfraction III schüttelte man mit 3 l Petroläther. Die tiefrot gefärbte wässrige Phase wurde mit Chloroform gewaschen, mit Kochsalz bis zu einer Konzentration von 10% versetzt und mit Phenol/Chloroform (1 g : 1 ml) erschöpfend extrahiert. Den Phenol-Chloroform-Extrakt wusch man ausgiebig mit 10% NaCl enthaltender 0,01N Salzsäure, filtrierte durch eine kleine Säule von 20 g Celite und fällte die Inhaltsstoffe durch Zugabe von 25 g Hyflo-Supercel, 500 ml Äther und 1 l Petroläther unter Rühren bei 0°. Das pulverige Gemenge aus Filterhilfsmittel und Niederschlag wurde gut mit Äther gewaschen und hierauf mit wenig Methanol eluiert. Aus dem Methanoleluat erhielt man beim schonenden Eindampfen 982 mg rohes Ferrioxamin B als braunrotes Pulver.

Die noch sehr uneinheitlichen Verteilungsfractionen II, IV und V wurden jeweils mit entsprechenden Fractionen aus weiteren CRAIG'schen Verteilungen vereinigt und auf gleiche Weise aufgearbeitet.

**4. Ionenaustausch-Chromatographie der Verteilungsfractionen II, III, IV und V.** – Zur Isolierung der Ferrioxamine A, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E und F wurden die bei der Gegenstromverteilung von Rohferrioxamin anfallenden Verteilungsfractionen II, III, IV bzw. V an Dowex 50 WX<sub>2</sub> (100/200 mesh) mit Ammoniumacetatpuffer als Elutionsmittel chromatographiert. Das Harz reinigte man vorerst nach der Vorschrift von HIRS *et al.*<sup>12)</sup>. Es wurde in der Ammoniumform durch Sedimentation auf die Säule gebracht und vorgängig der Substanzaufladung 70–100 Std. mit der zur Elution verwendeten Pufferlösung bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von ca. 20 ml/cm<sup>2</sup>/Std. äquilibriert. Die Substanzen trug man je nach Löslichkeit in 1–10-proz. Lösung auf die Säule auf und entwickelte die Chromatogramme bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 5–15 ml/cm<sup>2</sup>/Std. mit Ammoniumacetatpuffer von pH 4,5–4,7 in steigender Konzentration (Gradient-Elution). Die Bewertung der Chromatogramme erfolgte durch Extinktionsmessung bei 425 m $\mu$ . Die entsprechend zusammengefassten Eluatfractionen wurden nach Zusatz von 10% Kochsalz mit Phenol/Chloroform (1 g : 1 ml) erschöpfend extrahiert und nachfolgend in der bereits beschriebenen Weise als Trockensubstanz gewonnen.

4a. *Chromatographie von III: Ferrioxamin B* (vgl. Fig. 5 und Tab. 2). Säule: 66 cm  $\times$  7,14 cm<sup>2</sup>. Substanzmenge: 865 mg. Pufferlösung bei Beginn: 0,2M, pH 4,6. Durchlaufgeschwindigkeit:

<sup>12)</sup> C. H. W. HIRS, S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 219, 623 (1956).

100 ml/Std. Umstellung auf Gradient-Elution mit 1 l Mischkammer und Zufluss von 2 M, pH 4,7-Puffer nach 72 Std. Volumen der Eluatfraktionen: 40 ml. Mit der Numerierung der Fraktionen wurde kurz vor Austritt der ersten gefärbten Bande begonnen.

Tabelle 2. *Ferrioxamin B* durch Ionenaustausch-Chromatographie

Fraktion	Menge in mg	Substanz
13–18	62	noch nicht näher charakterisiert
93–125	544	<i>Ferrioxamin-B-hydrochlorid</i>
185–197	36	nicht identifiziert

*Ferrioxamin-B-hydrochlorid*, das man als braunrotes Pulver erhielt, ist löslich in Wasser, Methanol, Alkohol, Phenol, Dimethylformamid und Eisessig, schlecht löslich in Butanol und praktisch unlöslich in Chloroform, Aceton, Äther und Essigester. Zur Analyse wurde das Präparat einmal aus Methanol-Aceton und viermal aus Methanol-Essigester umgefällt und hierauf 24 Std. bei 80°/0,001 Torr über  $P_2O_5$  getrocknet. Einwaage und Nach Trocknung im Schweinchen.

Gef. C 46,17 H 7,46 N 12,90 Fe 8,54%

IR.-Absorptionsspektrum, vgl. Fig. 3, Kurve 1. Titration, UV.-Absorption, vgl. Tab. 1. Papierchromatographie und -elektrophorese: Nachweis durch Eigenfarbe, Farbreaktionen mit  $FeCl_3$ - $K_3Fe(CN)_6$ -Reagens<sup>7)</sup> (Blaufärbung), Ninhydrin (Blaufärbung), REINDEL-HOPPE<sup>8)</sup> (Blaufärbung) und bioautographische Entwicklung (vgl. Fig. 1 und 2 sowie Tab. 1). Verteilungskoeffizient im System VI (vgl. Tab. 1): Bestimmung durch CRAIG'sche Verteilung von 10 mg über 34 Stufen zu je 3 ml organischer und 3 ml wässriger Phase bei 23–25°; Extinktionsmessung (425 m $\mu$ , 2 cm) der mit Alkohol auf 10 ml verdünnten Fraktionen.

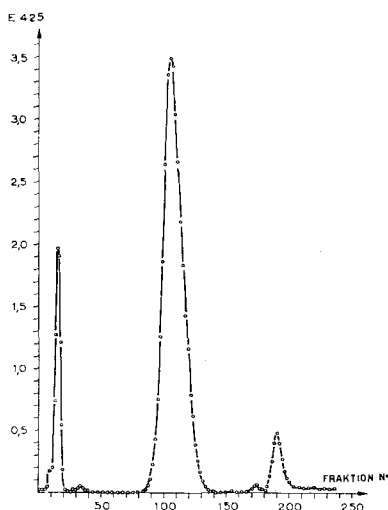


Fig. 5. Chromatographie von Verteilungsfraction III an Dowex 50  $WX_2$

-o-o- Extinktion bei 425 m $\mu$

Rote Lösungen von *Ferrioxamin B* werden durch Zusatz von Natriumdithionit entfärbt. Die dabei erhaltenen Lösungen gewinnen beim Stehen an der Luft die ursprüngliche Färbung zurück. Das im *Ferrioxamin B* gebundene Eisen wird dem Komplex bei der Einwirkung von Mineralsäuren oder starken Alkalien entzogen. Für den 3-wertigen Zustand des Eisens spricht auch der Befund, dass angesäuerte *Ferrioxamin-B*-Lösungen mit Kaliumferrocyanid, jedoch nicht mit Kaliumferricyanid, momentan unter Bildung von Berlinerblau reagieren.

4b. *Chromatographie von II: Ferrioxamin A* (vgl. Fig. 6 und Tab. 3). Säule: 90 cm  $\times$  22 cm<sup>2</sup>. Substanzmenge: 5 g. Pufferlösung bei Beginn: 0,1 M, pH 4,6. Durchlaufgeschwindigkeit: 110 ml/Std. Volumen der Eluatfraktionen: 35–40 ml. Umstellung auf Gradient-Elution mit 4 l Mischkammer und Zufluss von 0,9 M, pH 4,60 – Puffer bei Fraktion Nr. 90, und 1,75 M, pH 4,7 – Puffer bei Fraktion Nr. 283. Numerierung der Eluatfraktionen vom Zeitpunkt der Substanzaufrtragung an.

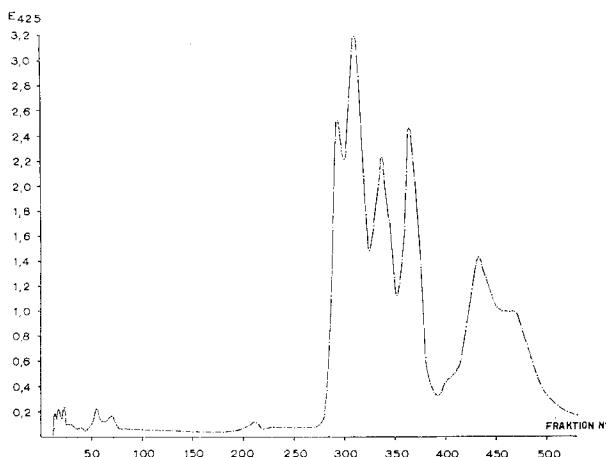


Fig. 6. *Chromatographie von Verteilungsfraction II an Dowex 50 WX<sub>2</sub>*  
 - - - - Extinktion bei 425 mμ

Tabelle 3. *Ferrioxamin A durch Ionenaustausch-Chromatographie*

Fraktion	Menge in mg	Substanz
283–300	302	<i>Ferrioxamin-A-hydrochlorid</i>
301–325	488	Gemisch von Ferrioxamin B + A
326–352	393	noch nicht näher charakterisiert
353–385	452	
416–445	415	

Ferrioxamin-A-hydrochlorid ist ein braunrotes Pulver, das sich in Wasser, Methanol, Alkohol, Eisessig und Dimethylformamid gut löst. Es ist unlöslich in Äther, Aceton, Essigester und Chloroform. Mikroanalyse<sup>13)</sup> nach 80 Std. bei 20°/0,03 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Fe 7,95%, Cl 5,93%. Titration, UV.-Absorption in H<sub>2</sub>O, Verteilungskoeffizient, Papierchromatographie und -elektrophorese, vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. Farbreaktionen wie bei Ferrioxamin B. IR.-Absorptionsspektrum in KBr (s = starke Bande, m = mittlere Bande, w = schwache Bande): 2,92(s); 3,42(m); 6,10(s); 6,32(s); 6,88(m); 7,30(w); 7,92(w); 8,10(w); 8,49(w); 8,98(w); 9,55(w); 10,15(w); 10,67(w) μ.

4c. *Chromatographie von IV: Ferrioxamin C* (vgl. Fig. 7 und Tab. 4). Umstellung auf Gradient-Elution mit 0,9 M, pH 4,6 – Puffer bei Fraktion Nr. 720, und mit 1,75 M, pH 4,7 – Puffer bei Fraktion Nr. 963. Übrige Bedingungen wie unter 4b.

Das als braunrotes Pulver erhaltene Ferrioxamin-C-hydrochlorid zeigt annähernd gleiche Löslichkeitseigenschaften wie A und B. Mikroanalyse<sup>13)</sup> nach 80 Std. bei 20°/0,03 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Cl 5,15%, Fe 6,82%. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: 2,92(s); 3,43(s); 5,85(m); 6,10(s); 6,33(s); 6,87(s); 7,30(m); 7,95(m); 8,23(w); 8,52(m); 9,65(w); 13,23(m) μ. Titration, UV.-Absorp-

<sup>13)</sup> Die C-, H- und N-Analysenwerte von solchen Ferrioxamin-Präparaten, die lediglich als amorphe Eindampfrückstände erhalten worden waren, zeigten grosse Streuungen. Wir verzichten deshalb auf ihre Angabe.



tion in  $H_2O$ , Verteilungskoeffizient, Papierchromatographie und -elektrophorese, vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. Farbreaktionen wie bei Ferrioxamin B.

4d. *Chromatographie von V*. 148 g Verteilungsfraktion V wurden vorerst auf einer Säule von  $150\text{ cm} \times 79\text{ cm}^2$  vorfraktioniert. Das Chromatogramm entwickelte man bei einer Durchflusgeschwindigkeit von 2–3 l/Std. während je 24 Std. mit 0,1 M, 0,2 M, 0,6 M und während 100 Std. mit 1,8 M Ammoniumacetatpuffer von pH 4,7. Es wurden Fraktionen von 5 l aufgefangen. Die zusammengefassten Fraktionen 2–5 enthielten gemäss Papierchromatographie vorwiegend Ferrioxamine  $D_1$ ,  $D_2$  und E (44 g), 48–55 hauptsächlich Ferrioxamin F (8,4 g).

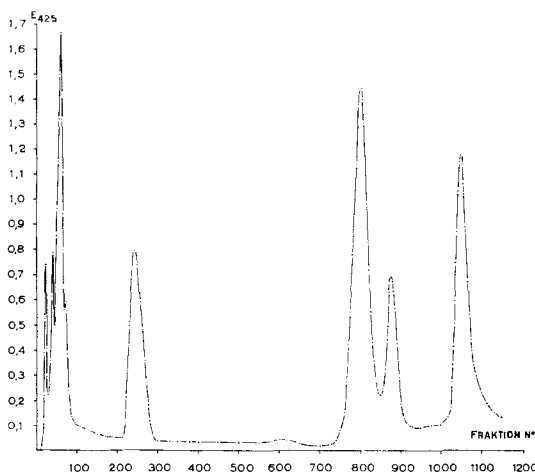


Fig. 7. *Chromatographie von Verteilungsfraktion IV an Dowex 50 WX<sub>2</sub>*  
 --- Extinktion bei 425  $m\mu$ .

Tabelle 4. *Ferrioxamin C durch Ionenaustausch-Chromatographie*

Fraktion	Menge in mg	Substanz
34–46	135	} noch nicht näher charakterisiert
54–68	226	
218–284	12	
780–830	430	Ferrioxamin-B-hydrochlorid
860–900	194	<i>Ferrioxamin-C-hydrochlorid</i>
1034–1080	360	noch nicht näher charakterisiert

Tabelle 5. *Ferrioxamine  $D_1$ ,  $D_2$  und E durch Ionenaustausch-Chromatographie*

Fraktion	Menge in mg	Substanz
48–56	980	<i>Ferrioxamin <math>D_1</math> und <math>D_2</math></i>
66–80	898	<i>Ferrioxamin E</i>

*Rechromatographie von Fraktion 2–5: Ferrioxamine  $D_1$ ,  $D_2$  und E* (Fig. 8 und Tab. 5). Bedingungen wie unter 4b, jedoch ohne Gradient-Elution.

Das aus Fraktion 48–56 isolierte Gemisch von  $D_1$  und  $D_2$  (980 mg) wurde in 100 ml Wasser gelöst, mit Kochsalz gesättigt und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt hinterliess nach dem Trocknen über Natriumsulfat beim Eindampfen 697 mg Ferrioxamin  $D_1$ . Das kochsalzhaltige, wässrige Raffinat wurde ausgiebig mit Chloroform gewaschen und hierauf mit Phenol-Chloroform aufgearbeitet: 95 mg Ferrioxamin  $D_2$ .

*Ferrioxamin D<sub>1</sub>* ist löslich in Wasser, Methanol, Alkohol, Eisessig, Methylcellosolve und Chloroform, schwer löslich in Äther, Aceton, Essigester, Pyridin und Dimethylformamid. Es kristallisiert aus Methanol-Äther in dunkelroten Nadeln. Smp. nach 3maliger Kristallisation 194–200°. Farbreaktion mit Ninhydrin negativ, REINDEL-HOPPE<sup>8)</sup> positiv. Mikroanalyse nach 24 Std. bei 80°/0,02 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C 49,06, H 7,50, N 12,56, Cl 0, Fe 8,45%. Titration in 80-proz. Methylcellosolve: keine sauren oder basischen Funktionen feststellbar. UV.-Absorption, Verteilungskoeffizient, Papierchromatographie und -elektrophorese, vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: 2,95(s); 3,06(s); 3,25(w); 3,43(s); 6,18(s); 6,35(s); 6,86(s); 7,30(m); 7,94(m); 8,20(w); 8,49(w); 8,83(w); 9,00(w); 9,65(w); 10,00(w); 10,31(w); 10,67(w); 12,20(w); 13,30(m)  $\mu$ .

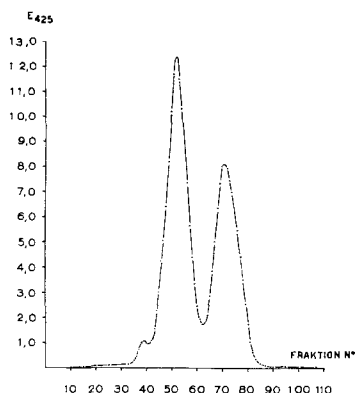


Fig. 8. Rechromatographie von Fraktion 2–5 an Dowex 50 WX<sub>2</sub>  
 - - - - Extinktion bei 425 m $\mu$

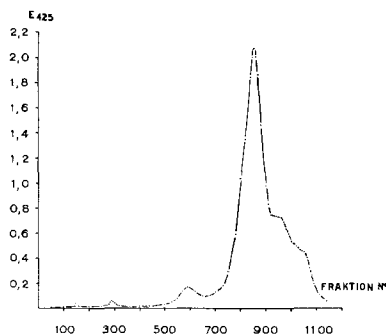


Fig. 9. Rechromatographie von Fraktion 48–55 an Dowex 50 WX<sub>2</sub>  
 - - - - Extinktion bei 425 m $\mu$

*Ferrioxamin D<sub>2</sub>* wurde bis anhin nicht in reiner Form erhalten. Papierchromatographie und -elektrophorese, vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. Farbreaktion mit Ninhydrin negativ, REINDEL-HOPPE<sup>8)</sup> positiv.

Das aus Fraktion 66–80 erhaltene *Ferrioxamin E* (898 mg) ist in Eisessig löslich, in den meisten Lösungsmitteln, insbesondere auch in Wasser und Methanol schwer- bis unlöslich. Durch 2maliges Umlösen aus viel Aceton-Wasser konnte es in mikrokristalliner Form erhalten werden. Mikroanalyse nach 60 Std. bei 25°/0,03 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C 49,80, H 7,37, N 12,48, Cl 0, Fe 8,14%. Titration: keine sauren oder basischen Funktionen feststellbar. IR.-Absorptionsspektrum, vgl. Fig. 3, Kurve 2. UV.-Absorption, Verteilungskoeffizient, Papierchromatographie und -elektro-

phorese, vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. Farbreaktion mit Ninhydrin negativ, REINDEL-HOPPE<sup>8)</sup> positiv.

*Rechromatographie von Fraktion 48–55: Ferrioxamin F* (Fig. 9 und Tab. 6). Pufferlösung bei Beginn: 0,5M Ammoniumacetat pH 4,7. Umstellung auf Gradient-Elution mit Mischkammer von 4 l und Zufluss von 1,75M Ammoniumacetatpuffer von pH 4,7 bei Fraktion 663. Übrige Bedingungen wie unter 4b.

Tabelle 6. *Ferrioxamin F durch Ionenaustausch-Chromatographie*

Fraktion	Menge in mg	Substanz
760–820	572	noch nicht näher charakterisiert
821–880	1124	
881–980	1074	vorwiegend <i>Ferrioxamin-F-hydrochlorid</i>
981–1072	539	
1073–1130	106	

Zur Weiterreinigung wurde Fraktion 821–880 im System n-Butanol-Wasser einer CRAIG'schen Verteilung über 20 Stufen (10/10 ml) unterworfen. Die Inhalte der Elemente extrahierte man anschliessend mit je 80 ml Petroläther, verwarf die Petrolätherphasen und lyophilisierte die wässrigen Raffinate. Mit dem aus den Elementen 1–4 gewonnenen Material (590 mg) wurde die Verteilung über 30 Stufen wiederholt. Aus Element 5 erhielt man 64 mg papierchromatographisch einheitliches Ferrioxamin-F-hydrochlorid als braunrotes Pulver. Mikroanalyse<sup>13)</sup> nach 63 Std. bei 20°/0,02 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Cl 4,10%, Fe 5,57%. IR.-Absorptionsspektrum in KBr: 2,95(s); 3,45(m); 6,10(s); 6,37(s); 6,92(m); 7,40(w); 7,97(w); 8,50(w); 8,88(w); 9,72(w); 10,10(w); 10,70(w); 13,75(w)  $\mu$ .

Ferrioxamin-F-hydrochlorid ist gut löslich in Wasser, Methanol, Pyridin, Eisessig, Äthanol, Dimethylformamid; wenig löslich in Chloroform; unlöslich in Essigester, Aceton, Äther. Papierchromatographie und -elektrophorese, Verteilungskoeffizient, Titration und UV.-Absorption vgl. Tab. 1 sowie Fig. 1 und 2. Farbreaktionen wie bei Ferrioxamin B.

#### SUMMARY

Isolation and properties of the ferrioxamines A, B, C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, E and F, iron containing growth factors belonging to the group of the sideramines, are described.

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