

261. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

27. Mitteilung¹⁾

Über die Konstitution von Ferrioxamin B

von H. Bickel, G. E. Hall, W. Keller-Schierlein, V. Prelog,
E. Vischer und A. Wettstein

(6. X. 60)

Von den in der vorhergehenden Mitteilung beschriebenen 7 Ferrioxaminen aus den Kulturen von *Streptomyces pilosus* ETTLINGER *et al.* besitzt das Ferrioxamin B nicht nur die stärkste Sideramin-Wirkung²⁾, sondern stellt auch gewichtsmässig den Hauptanteil des Gemisches dar. Es wurde deshalb als erster Vertreter dieser Verbindungsreihe eingehender chemisch untersucht.

Das Ferrioxamin-B-hydrochlorid, das als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen diente, stellt ein braunrotes amorphes Pulver dar, welches die für analoge Eisen(III)-Komplexe typische breite Bande bei 430–440 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 39$) zeigte; im UV. liegt dagegen bis auf eine Endabsorption keine typische Absorptionsbande vor. Von den starken Banden im IR.-Absorptionsspektrum (in Kaliumbromid) sind besonders diejenigen bei 3430, 1640 und 1580 cm⁻¹, die auf NH-CO-Gruppen hinweisen³⁾, erwähnenswert. Da das Ferrioxamin-B-Ion bei der Elektrophorese in 0,33N Essigsäure als Kation wandert¹⁾, handelt es sich offensichtlich um ein Ammonium-Ion, worauf auch der pK_{MCS}^* -Wert 9,74 hinweist, welcher im Bereich der Werte für aliphatische Ammonium-Ionen⁴⁾ liegt. Die analytischen Ergebnisse¹⁾ stimmen gut mit der Formel C₂₅H₄₆O₈N₆FeCl überein, die auf Grund der Abbauergebnisse abgeleitet wurde.

Besonders wichtig für die Konstitutionsaufklärung der Ferrioxamine sind die Ergebnisse der sauren Hydrolyse nach der Entfernung von Eisen(III)-Ionen. Vorversuche zeigten, dass eine direkte Hydrolyse des Ferrioxamins B, also in Gegenwart von Eisen(III)-Ionen, zu einem Gemisch von Verbindungen führt, welche durch Nebenreaktionen von primären Hydrolyseprodukten mit diesen Ionen entstehen. Die letzteren wurden deshalb nach Versetzen des Ferrioxamins B mit 6N Salzsäure durch erschöpfende Extraktion mit Äther als Eisen(III)-chlorid vor der Hydrolyse entfernt. Als Endprodukt der Hydrolyse wurden dann nur *Essigsäure*, *Bernsteinsäure* und *1-Amino-5-hydroxylamino-pentan* papierchromatographisch nachgewiesen und präparativ isoliert.

¹⁾ 26. Mitt.: Helv. 43, 2118 (1960).

²⁾ H. ZÄHNER, R. HÜTTER & E. BACHMANN, Arch. Microbiol. 36, 325 (1960).

³⁾ Vgl. R. NORMAN JONES & C. SANDORFY, in W. WEST, Chemical Applications of Spectroscopy, Interscience, New-York – London 1956, S. 521.

⁴⁾ W. SIMON, G. H. LYSSY, A. MÖRIKOFER & E. HEILBRONNER, Zusammenstellung von scheinbaren Dissoziationskonstanten im Lösungsmittelsystem Methylcellosolve/Wasser, ETH Zürich, 1959.

Die Konstitutionsaufklärung und Synthese des 1-Amino-5-hydroxylaminopentans, das als Dihydrochlorid gefasst worden war, wurde in einer früheren Mitteilung beschrieben⁵⁾.

Durch besondere Versuche wurde festgestellt, dass das Verhältnis Essigsäure: Bernsteinsäure:1-Amino-5-hydroxylaminopentan 1:2:3 ist. Man findet also in den Hydrolyseprodukten 6 basische und 5 saure Gruppen. Wenn man berücksichtigt, dass bei der elektrometrischen Titration vom Ferrioxamin-B-hydrochlorid nur eine dem Ammonium-Ion entsprechende Stufe mit pK_{MCS}^* 9,74 und Äquivalentgewicht von etwa 650 gefunden wurde, so muss einer von den primären Aminostickstoffen als Ammonium-Ion vorliegen, da das Hydroxylammonium-Ion einen viel niedrigeren pK_{MCS}^* -Wert ($\sim 5,3-5,6$) besitzt. Von den anderen 5 Stickstoffatomen müssen 2 in Amid- und 3 in Hydroxamsäure-Resten vorliegen. Für den eisenfreien Grundkörper des Ferrioxamins B kann demnach aus den gefundenen Hydrolyseprodukten durch Abspaltung von 5 Mol. Wasser die Formel $C_{25}H_{48}O_8N_6$ abgeleitet werden. Durch Ersatz von drei Wasserstoffatomen durch ein Eisen(III)-Ion kommt man für die Ferrioxamin-B-Base zur Formel $C_{25}H_{45}O_8N_6Fe$.

Mit 2,4-Dinitrofluorbenzol gibt das Ferrioxamin-B-hydrochlorid ein sehr schwach basisches 2,4-Dinitrophenyl-Derivat $C_{31}H_{47}O_{12}N_8Fe$, welches papierchromatographisch einheitlich ist und bei der Elektrophorese in 0,33 N Essigsäure nur langsam gegen die Kathode wandert.

Einen weiteren Beweis für die Richtigkeit der Formel von Ferrioxamin B stellen die Produkte der Benzoylierung nach SCHOTTEN-BAUMANN dar. Die Lösung von Ferrioxamin B in 1 N Natronlauge wurde nach Abtrennung des ausgeschiedenen Eisen(III)-hydroxyds mit Benzoylchlorid geschüttelt. Es konnte dabei eine neutrale, farblose, amorphe Verbindung erhalten werden, deren Analysen mit einer Formel $C_{53}H_{64}O_{12}N_6$ übereinstimmen. Ihr IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform zeigt neben den Banden bei 3450, 3350, 1660 und 1530 cm^{-1} , welche auf CONH hinweisen³⁾, eine Bande bei 1767 cm^{-1} , die wir dem «Estercarbonyl» in der Gruppierung $-CON(R)-O-CO-C_6H_5$ zuschreiben⁶⁾. Auf Grund dieser Ergebnisse und des UV.-Absorptionsspektrums (λ_{max} 233 und 275 $m\mu$) nehmen wir an, dass das Benzoylierungsprodukt ein O, O', O'', N-Tetrabenzoyl-Derivat des Grundkörpers $C_{25}H_{48}O_8N_6$ ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme gibt die Verbindung mit methanolischem Ammoniak, unter Abspaltung von 3 Benzoylresten als Benzamid, eine neutrale, farblose kristalline Verbindung $C_{32}H_{52}O_9N_4$, welche das N-Benzoyl-Derivat des Grundkörpers $C_{25}H_{48}O_8N_6$ darstellt. Das IR.-Absorptionsspektrum zeigt Banden bei 3310, 1623 und 1565 cm^{-1} , doch fehlt diejenige bei 1767 cm^{-1} . Unter den Produkten der Hydrolyse mit 6 N Salzsäure liessen sich erwartungsgemäss Benzoesäure, Essigsäure, Bernsteinsäure und 1-Amino-5-hydroxylaminopentan nachweisen.

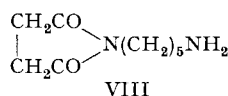
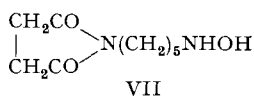
Alle diese Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass der eisenfreie Grundkörper des Ferrioxamins B ein fadenförmiges Trihydroxamsäure-Derivat ist, welches mit Eisen(III)-Ion einen allem Anschein nach oktaedrischen Komplex bildet. Für den eisenfreien Grundkörper kommen auf Grund der Hydrolyseergebnisse vier Formeln

⁵⁾ H. BICKEL, B. FECHTIG, G. E. HALL, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & E. VISCHER, *Helv.* **43**, 901 (1960).

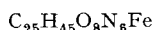
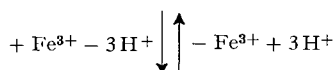
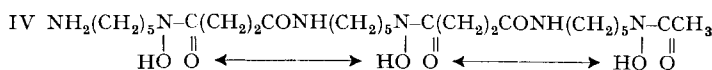
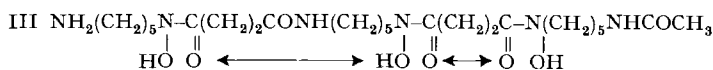
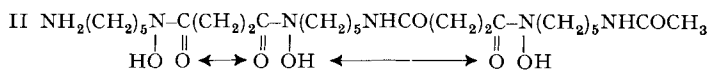
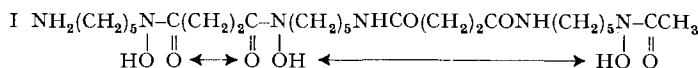
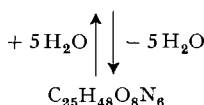
⁶⁾ J. P. FREEMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 5954 (1958).

I–IV in Betracht, die sich nur durch Anordnung der mittleren Komponenten unterscheiden.

Es ist nun zu erwähnen, dass sich aus der farblosen Lösung, die durch Behandlung des Ferrioxamins in 1N Natronlauge und Abzentrifugieren des Eisen(III)-hydroxyds erhalten wird, nach Ansäuern mit Salzsäure und Zugabe von Eisen(III)-chlorid das Ferrioxamin-B-hydrochlorid leicht zurückbildet. Das erhaltene Produkt ist nicht nur nach seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften mit dem Ausgangsmaterial identisch, sondern zeigt auch eine volle biologische Sideramin-Wirkung im Antagonismus-Test gegenüber Ferrimycinen²⁾. Auch das N-Benzoyl-Derivat des eisenfreien Grundkörpers von Ferrioxamin B gibt einen analogen Eisen(III)-Komplex, welcher Sideramin-Wirksamkeit besitzt.



VI



Eine so leichte, spontane Bildung der stabilen Eisen(III)-Komplexe aus beiden fadenförmigen Trihydroxamsäure-Derivaten kann man nur dann erwarten, wenn die Ketten, welche die Hydroxamsäure-Reste verbinden, genügend lang sind. Es lässt sich an Modellen⁷⁾ zeigen, dass eine Komplexbildung gar nicht möglich ist, wenn diese Ketten aus 2 Methylengruppen bestehen, wie sie in den Konstitutionen I bis III vorkommen. Es bleibt also für den eisenfreien Grundkörper nur die Konstitution IV übrig, die durch eine regelmässige «Kopf-Schwanz»-Anordnung der Komponenten und eine Trennung der Hydroxamsäure-Reste durch 9 Kettenglieder charakterisiert ist.

⁷⁾ Wir verwendeten dafür die von A. S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1339 (1959), beschriebenen Modelle.

Der Eisen(III)-Komplex-Anteil des Ferrioxamins B wurde durch sein magnetisches und polarographisches Verhalten charakterisiert.

Auf unsere Bitte hat F. MABBS im Laboratorium von Professor R. S. NYHOLM, University College, London, die magnetische Suszeptibilität von Ferrioxamin-B-hydrochlorid bestimmt. Aus der gefundenen molaren magnetischen Suszeptibilität $\chi_m = 14,310 \times 10^{-6}$ cgs Einheiten ergibt sich unter Vernachlässigung der diamagnetischen Beiträge der Liganden das magnetische Moment $\mu_{\text{eff}} = 5,86$ BOHR'sche Magnetonen (298°K). Für ein Eisen(III)-Ion mit 5 nichtgepaarten Spin-freien Elektronen ist das berechnete magnetische Moment $\mu_{\text{ber}} = \sqrt{5(5+2)} = 5,92$. Daraus folgt, dass es sich beim Ferrioxamin B um einen sog. ionischen Komplex⁸⁾ handelt.

Von den Ergebnissen der von A. WALSER ausgeführten polarographischen Untersuchungen des Ferrioxamins B⁹⁾ und anderer Siderochrome, über die wir in einer späteren Mitteilung eingehender berichten wollen, seien nur die wichtigsten erwähnt. Bei neutraler Reaktion (pH 6,8 bis 8,3) weist das Ferrioxamin-B-hydrochlorid in 1N Kaliumchlorid eine einzige polarographische Stufe mit dem bemerkenswert negativen Halbstufenpotential $E_{1/2} = -0,697 \pm 0,008$ V gegenüber NKE auf. Diese Stufe entspricht offenbar der reversiblen Reaktion $\text{Fe}^{3+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$. Sie ist im untersuchten Konzentrationsbereich (0,6 bis 1,7 mMol·l⁻¹) proportional der Konzentration und kann zur quantitativen Bestimmung verwendet werden. Das Halbstufenpotential ändert sich nicht in 1N bis 4N Kaliumfluorid- oder 0,5M Kaliumtartrat-Lösungen in demselben pH-Bereich. Der Ferrioxamin-B-Komplex ist dagegen offenbar nicht stabil in sauren Lösungen. Bei pH < 5 findet man im Polarogramm eine zusätzliche Stufe mit $E_{1/2} = -0,366$ V. Die beiden Stufen zeigen bei etwa pH 3,5 die gleiche Höhe; bei pH 3 ist nur noch die zweite Stufe feststellbar, die offensichtlich einer neuen Komplex-Species zukommt.

Das ganze polarographische Verhalten weist auf eine bemerkenswerte Stabilität des Ferrioxamin-B-Komplexes hin, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass der eisenfreie Grundkörper ein Hexadentat mit räumlich günstiger Verteilung der komplexbildenden Hydroxamat-Reste darstellt. Das verwandte Eisen(III)-tri-acethydroxamat¹⁰⁾ zeigt vergleichsweise unter analogen Bedingungen ein $E_{1/2} = -0,476$ V und wird von 0,5M Kaliumtartrat-Lösung bei pH 7,7 zerstört.

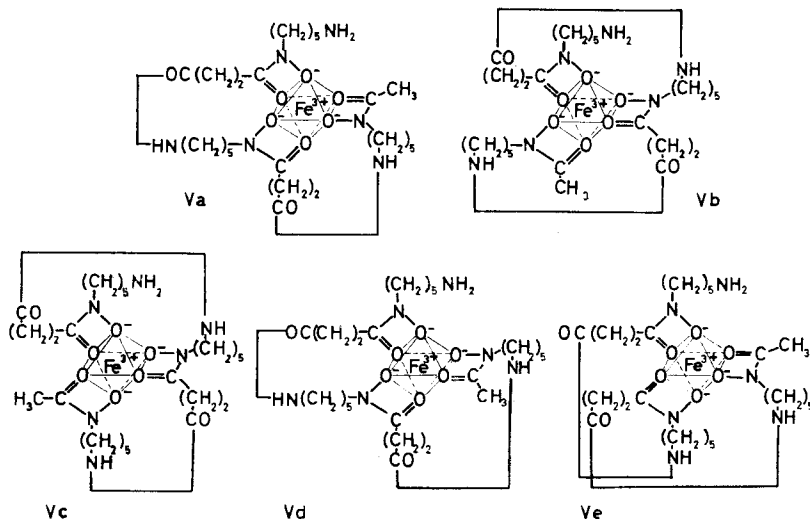
Zur Konfiguration von Ferrioxamin B lässt sich folgendes sagen: Ein oktaedrisches Ion kann im allgemeinen Fall mit einem fadenförmigen Trihydroxamsäure-Derivat 8 diastereomere Komplexe bilden, von welchen jeder ein Enantiomeren-Paar darstellt. Eine Verminderung der möglichen Konfigurationen ergibt sich in unserem Fall aus der Tatsache, dass die zwei Ketten, welche die Hydroxamat-Reste im Ferrioxamin B verbinden, nur aus 9 Gliedern bestehen. Solche Ketten genügen nicht, um ein -NO⁻ eines ersten mit dem -CO eines zweiten Hydroxamat-Restes in diagonaler Lage zu verknüpfen. Dadurch fallen 3 diastereomere Konfigurationen ausser Betracht. Es stehen demnach noch die 5 diastereomeren Konfigurationen Va bis e und ihre Enantiomere zur Diskussion. Von diesen unterscheidet sich Va von den andern vier durch eine vicinale Lage der drei geladenen Sauerstoffatome. Diese ist aus elektrostatischen Gründen weniger stabil als diejenige in den Konfi-

⁸⁾ Vgl. A. EHRENBERG, Nature 178, 379 (1956).

⁹⁾ A. WALSER, Diplomarbeit ETH Zürich, 1960.

¹⁰⁾ A. HANTZSCH & C. H. DESCH, Liebigs Ann. Chem. 323, 1 (1902).

gurationen Vb bis e, bei welchen die negativ geladenen Sauerstoffatome durch das positive Eisen(III)-Ion stärker getrennt sind¹¹⁾. Von den letzterwähnten Konfigurationen ist Vb dadurch charakterisiert, dass die Endgruppen der Fadenmolekel in ihr diagonal liegen. Sie unterscheidet sich räumlich wesentlich von den übrigbleibenden Konfigurationen Vc bis e mit einer vicinalen Lage der Endgruppen. Diese letzteren drei



Konfigurationen sind in ihrem räumlichen Bau sehr ähnlich und es ist fraglich, ob sie genügend verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften besitzen würden, um sich mit den heutigen Mitteln trennen zu lassen. Dem spontan aus dem komplexbildenden Trihydroxamsäure-Derivat IV und Eisen-(III)Ion entstehenden Ferrioxamin B kommt deshalb wahrscheinlich entweder die Konfiguration Vb zu, oder es stellt ein Gemisch der drei Diastereomere Vc bis e dar. Eine Entscheidung ist auf chemischem Wege kaum möglich, sie wird wahrscheinlich durch die röntgenographische Strukturbestimmung an einem geeigneten kristallinen Derivat getroffen werden müssen.

Das optische Drehungsvermögen des Ferrioxamins B konnte wegen der starken Absorption bisher nur im grünen Gebiet des sichtbaren Spektrums gemessen werden; das untersuchte Präparat war praktisch optisch inaktiv. Die von uns isolierten Präparate stellen somit Racemate dar, wie nicht anders zu erwarten war, da der Komplex aus dem symmetrischen eisenfreien Grundkörper zum grossen Teil erst bei der Isolierung gebildet wird¹⁾ und wahrscheinlich auch im Organismus durch eine nichtenzymatische Reaktion entsteht.

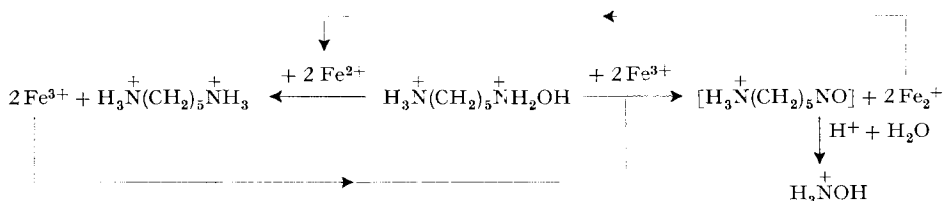
Neben den für die Konstitutionsbestimmung wesentlichen primären Endprodukten der Hydrolyse wurden im Laufe unserer Untersuchung Produkte isoliert, die sich durch Nebenreaktionen aus primären bilden. Die Entstehung dieser sekundären Produkte lässt sich auf Grund der aufgestellten Konstitution leicht erklären.

Bei der sauren Hydrolyse von Ferrioxamin B wurde zuerst papierchromatographisch eine Verbindung festgestellt, welche sowohl mit Ninhydrin als auch mit Triphenyltetrazoliumchlorid

¹¹⁾ Y. TANITO, Y. SAITO & H. KUROVA, Bull. chem. Soc. Japan 25, 188 (1952).

Farbreaktionen gibt. Sie entsteht besonders bei energischer Hydrolyse mit 6N Salzsäure, also unter den Bedingungen, die gewöhnlich für die totale Hydrolyse von Proteinen verwendet werden, und konnte durch Chromatographie an Silikagel als farbloses öliges Hydrochlorid isoliert werden. Durch katalytische Hydrierung wurde daraus unter Verbrauch von 1 Mol. Wasserstoff eine ölige Verbindung $C_9H_{17}N_2O_2Cl$ erhalten, die stark mit Ninhydrin, dagegen nicht mehr mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid reagierte. Es handelt sich um das N-(5-Aminopentyl)-succinimid-hydrochlorid (VIII), das durch katalytische Hydrierung aus N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid VII entstanden ist. Im Einklang damit zeigen die beiden Verbindungen im IR.-Absorptionsspektrum Banden bei 1697 und 1770 cm^{-1} bzw. 1685 und 1765 cm^{-1} , die typisch für Succinimide sind¹²⁾.

Bei der Hydrolyse von Ferrioxamin B mit Salzsäure, ohne vorhergehende Entfernung von Eisen(III)-Ionen, findet man neben den primären Hydrolyseprodukten zwei weitere Verbindungen, die durch sekundäre Reaktionen aus 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan entstehen: freies Hydroxylamin und 1,5-Diaminopentan. Durch Modellversuche liess sich zeigen, dass das Eisen(III)-chlorid das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan (VI), vermutlich über das 1-Amino-5-nitroso-pentan als instabiles Zwischenprodukt, unter gleichzeitiger Entstehung von Eisen(II)-Ionen zu Hydroxylamin oxydiert. Die Eisen(II)-Salze reagieren mit 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan unter Bildung von Eisen(III)-Ionen und 1,5-Diaminopentan. Dadurch (vgl. Formelschema) wird nicht nur die Anwesenheit des letzteren Nebenproduktes im Hydrolysat, sondern auch die Tatsache erklärt, dass 1 Mol Eisen(III)-chlorid mit einem Überschuss von 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan mehr als 0,5 Mol Hydroxylamin liefert.



Dem Ferrioxamin B und anderen Ferrioxaminen nahe verwandt sind besonders die Antibiotica *Ferrimycine* und *Albomycin*^{5) 13)}, welche nicht nur Hydroxamat-eisen(III)-Komplexe sind, sondern auch das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan als wesentliches Hydrolyseprodukt liefern⁵⁾. Ein einfaches eisenfreies Derivat der letzteren Verbindung und der Bernsteinsäure ist das Antibioticum *Nocardamin*¹⁴⁾. Die chemisch verwandte 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan-carbonsäure-(1) wurde vor mehreren Jahren unter den Hydrolyseprodukten des komplizierten bakteriellen Wuchsstoffes *Mycobactin* gefunden¹⁵⁾.

Von den Wuchsstoffen der Sideramin-Reihe ist neuerdings *Ferrichrom* von T. EMERY & J. B. NEILANDS¹⁶⁾ als ein Tri-hydroxamat-eisen(III)-Komplex eines Grundkörpers unbekannter Konstitution erkannt worden. Da als Hydrolyseprodukte des Ferrichroms Ornithin, Methylglutaconsäure und 3 Mol. Hydroxylamin beschrieben sind, scheint sich dieser in seiner Struktur vom Ferrioxamin B wesentlich zu unterscheiden. Über die Komponenten und Konstitution anderer Sideramine und Sidero-

¹²⁾ A. W. BAKER, J. phys. Chem. 61, 450 (1957).

¹³⁾ H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Experientia 16, 129 (1960).

¹⁴⁾ R. F. C. BROWN, G. BÜCHI, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG & J. RENZ, Helv. 43, 1868 (1960).

¹⁵⁾ J. FRANCIS, H. M. MACTURK, J. MADINAVEITIA & G. A. SNOW, Biochem. J. 55, 596 (1953); G. A. SNOW, J. chem. Soc. 1954, 2588, 4080.

¹⁶⁾ T. EMERY & J. B. NEILANDS, J. Amer. chem. Soc. 82, 3658 (1960); Nature 184, 1632 (1959).

mycine¹³⁾ ist wenig bekannt, obwohl es recht wahrscheinlich ist, dass es sich ebenfalls um Hydroxamat-eisen(III)-Komplexe handelt.

Die Tatsache, dass alle diese Verbindungen hochwirksame Wuchsstoffe bzw. Antibiotica darstellen, ist bemerkenswert und muss eine biologische Bedeutung besitzen. Die nun vorliegenden Methoden zur Isolierung und Reindarstellung der Ferrioxamine, und nicht zuletzt auch die Aufklärung der Konstitution eines stark wirkenden Vertreters dieser Verbindungsgruppe, sollen dazu dienen, diese leichter zu erforschen.

Wir danken Professor R. S. NYHOLM, University College, London, für die Bestimmung der magnetischen Eigenschaften von Ferrioxamin-B-hydrochlorid.

Einer von uns (G. E. H.) dankt dem DEPARTMENT OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH OF GREAT BRITAIN für ein Research Fellowship, welches ihm die Beteiligung an dieser Arbeit ermöglichte.

Experimenteller Teil¹⁷⁾

Ferrioxamin-B-hydrochlorid. Die in der vorhergehenden Mitteilung veröffentlichten Analysen eines mehrmals umgefällten und sorgfältig getrockneten amorphen Präparates stimmen sehr gut überein mit der in dieser Abhandlung abgeleiteten Formel

| | | | | | | |
|--------------------------|------|---------|--------|---------|---------|----------|
| $C_{25}H_{46}O_8N_6ClFe$ | Ber. | C 46,12 | H 7,12 | N 12,91 | Cl 5,45 | Fe 8,58% |
| | Gef. | „ 46,17 | „ 7,46 | „ 12,90 | „ 5,29 | „ 8,54% |

N-(2,4-Dinitrophenyl)-ferrioxamin B. Eine Lösung von 450 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid und 450 mg Natriumhydrogencarbonat in 25 ml Wasser wurde mit 450 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 26 ml Alkohol vermischt und 5 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der Alkohol wurde dann im Vakuum abdestilliert und das überschüssige Reagens durch Ausschütteln mit Äther entfernt. Die wässrige Lösung wurde 3mal mit n-Butanol ausgezogen, wobei der rotbraune Komplex vollständig in die organische Phase überging. Die Butanol-Auszüge wurden mit Wasser gewaschen und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand nahm man in Aceton auf, filtrierte von braunen, unlöslichen Anteilen ab und fällte das Dinitrophenyl-Derivat mit Äther aus. Man erhielt 338 mg amorphes orangebraunes Pulver. Zur Analyse wurde noch 3mal aus Aceton-Äther umgefällt und über Phosphorpentoxyd bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

| | | | | | |
|---------------------------|------|---------|--------|---------|----------|
| $C_{31}H_{47}O_{12}N_8Fe$ | Ber. | C 47,76 | H 6,08 | N 14,38 | Fe 7,16% |
| | Gef. | „ 47,24 | „ 6,50 | „ 13,88 | „ 7,08% |

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{\max} in $m\mu$ ($\log \epsilon$): 212 (4,67); 264 (4,20, S); 353 (4,55); 405 (4,21, S) (S = Schulter). Bei der Papierelektrophorese in 0,33 N Essigsäure wandert das Dinitrophenyl-Derivat als einheitlicher Fleck etwa 0,3mal so weit wie Ferrioxamin B. Es zeigt im Antagonismus-Test mit Ferrimycinen²⁾ eine ähnlich hohe Sideramin-Wirkung wie Ferrioxamin-B-hydrochlorid.

Rückbildung des Ferrioxamins B aus dem eisenfreien Grundkörper und Eisen(III)-chlorid. 300 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid in 10 ml Wasser wurden mit 20 ml 1 N Natronlauge versetzt und das ausgeschiedene Eisen(III)-hydroxyd abzentrifugiert. Das Filtrat neutralisierte man sofort mit 1 N Salzsäure, wobei man eine fast farblose Lösung erhielt. Diese wurde mit 200 mg Eisen(III)-chlorid, 6H₂O in 10 ml Wasser versetzt, wobei sich sofort die tiefe für Ferrioxamine typische Farbe entwickelte. Nach 15 Min. schüttelte man die Lösung 3mal mit je 10 ml Chloroform-Phenol(1:1) aus. Die Extrakte wurden mit wenig Wasser gewaschen und mit 100 ml Äther versetzt, wobei das Ferrioxamin-B-hydrochlorid als amorpher rotbrauner Niederschlag ausfiel. Dieser wurde mehrmals mit Äther gewaschen, in 30 ml Methanol gelöst und im Vakuum eingedampft. Die Absorptionsspektren des erhaltenen Präparates im UV., Sichtbaren und IR. stimmten mit denjenigen des Ferrioxamin-B-hydrochlorids völlig überein. In den Papierchromatogrammen mit den für die Trennung der Ferrioxamine bewährten Systemen¹⁾ sowie bei der

¹⁷⁾ Die UV.-Absorptionsspektren wurden in Feinsprit mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Mod. DK 1, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER-Zweistrahlspektrophotometer, Mod. 21, aufgenommen.

Elektrophorese zeigten das zurückgebildete und das ursprüngliche Ferrioxamin-B-hydrochlorid dasselbe Verhalten. Im Antagonismus-Test mit Ferrimycinen war ebenso kein Unterschied festzustellen. 10 mg des ursprünglichen und des durch Rekombination erhaltenen Präparates wurden 10 Min. bei 100° mit 1N Salzsäure hydrolysiert. Die Hydrolysate enthielten nach papierchromatographischer Analyse die gleichen Hydrolyseprodukte.

O,O',O'',N-Tetrabenzoyl-Derivat des eisenfreien Grundkörpers. 182 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid wurden in 8 ml 1N Natronlauge gelöst und die farblose Lösung vom braunen Niederschlag abzentrifugiert. 0,6 ml Benzoylchlorid wurde zugefügt und das Gemisch 45 Min. geschüttelt. Nach Zugabe von 2 ml 1N Natronlauge und Chloroform wurde das Schütteln weitere 45 Min. fortgesetzt, worauf man die Chloroformschicht mit Natriumsulfat trocknete und eindampfte. Das zurückgebliebene Öl wurde aus methanolischer Lösung mit Wasser gefällt und im Hochvakuum scharf getrocknet. $C_{53}H_{64}O_{12}N_6$ Ber. C 65,14 H 6,60% Gef. C 65,44 H 6,54%

N-Benzoyl-Derivat des eisenfreien Grundkörpers. 550 mg rohes O,O',O'',N-Tetrabenzoyl-Derivat, hergestellt aus 450 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid, wurden in 50 ml bei 0° gesättigtem methanolischen Ammoniak gelöst und 18 Std. stehengelassen. Nach dem Eindampfen blieb ein Pulver zurück, welches man 3mal mit Äther extrahierte. Der unlösliche Rückstand (300 mg) konnte aus Methanol oder aus Essigsäure-Äther umkristallisiert werden, Smp. 179–180°.

$C_{32}H_{52}O_9N_6$ Ber. C 57,81 H 7,88 N 12,64%
Gef. „ 57,54 „ 7,94 „ 12,50; 12,35%

Der Ätherauszug gab beim Eindampfen 156 mg eines weissen kristallinen Rückstandes, der nach Umkristallisation aus Aceton-Äther und Sublimation durch den Misch-Smp. (128–130°) als Benzamid identifiziert wurde.

28 mg des N-Benzoyl-Derivates wurden mit 6N Salzsäure im Einschlussrohr 10 Std. bei 105° hydrolysiert. Nach Abkühlen wurden die ausgeschiedenen Kristalle abfiltriert und nach Sublimieren im Vakuum durch Smp. und IR.-Absorptionsspektrum als Benzoesäure identifiziert. Im Hydrolysat wurden papierchromatographisch mit dem Fließmittel Alkohol-Ammoniak-Wasser (8:1:1) Essigsäure und Bernsteinsäure nachgewiesen. Mit dem Fließmittel n-Butanol und 6N Salzsäure (7:3) und Entwicklung mit Triphenyltetrazoliumchlorid liessen sich 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan (VI) und N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid (VII vgl. unten) nachweisen.

Saure Hydrolyse von Ferrioxamin B. – *Isolierung der Essigsäure.* 201 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid wurden mit 6,7 ml Wasser und 3,3 ml konz. Schwefelsäure 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Die flüchtigen Säuren wurden abdestilliert, wobei man das abdestillierte Wasser von Zeit zu Zeit ersetzte. Das Destillat (30 ml) wurde mit 2,9 ml 0,1N Natronlauge (ber. 3,1 ml) auf Phenolphthalein neutralisiert, das Phenolphthalein durch Ausschütteln mit Äther entfernt und die wässrige Lösung eingedampft. Den Rückstand kochte man mit 50 mg p-Phenylphenacylbromid in 5 ml Alkohol 1½ Std. unter Rückfluss. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ergab 43 mg farblose Kristalle, die nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther und Sublimation im Hochvakuum bei 113–114,5° schmolzen. Die Identität mit p-Phenylphenacylacetat wurde durch Misch-Smp., IR.-Absorptionsspektrum und Dünnschichtchromatogramm bewiesen.

Isolierung der Bernsteinsäure. 99 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid wurden in 1,1 ml 6N Salzsäure gelöst. Die tiefrote Lösung extrahierte man mit Äther in einem KUTSCHER-STEUDEL-Extraktionsapparat. Die erhaltene farblose wässrige Lösung wurde mit 0,5 ml 6N Salzsäure versetzt und 17 Std. im Einschmelzrohr auf 113° erhitzt. Das Hydrolyseprodukt wurde wieder mit Äther extrahiert, wodurch man 17 mg farblose Nadeln erhielt, welche zuerst aus Äther-Petroläther umkristallisiert und dann im Hochvakuum sublimiert wurden. Smp. 177–178,5°; gef. C 40,75 H 5,29%; pK_{MCS}^* 6,13 und 8,20. Nach Misch-Smp. und IR.-Absorptionsspektrum war die Verbindung identisch mit Bernsteinsäure.

Die Isolierung von 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan wurde in der 24. Mitt.⁵⁾ beschrieben.

Nachweis von N-(5-Hydroxylaminopentyl)-succinimid (VII). Eine Lösung von 1,04 g Ferrioxamin-B-hydrochlorid in 6 ml 6N Salzsäure wurde zuerst durch Extraktion mit Äther vom Eisen-(III)-chlorid befreit und dann im Einschmelzrohr 20 Std. auf 94° erhitzt. Das Produkt wurde nach Abtrennung der Bernsteinsäure durch Extraktion mit Äther zur Trockne eingedampft. Den Rückstand extrahierte man mehrmals mit Chloroform, wobei 560 mg (61% d. Th.) schwer lösliches 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan-dihydrochlorid zurückblieben. Die Chloroform-Extrakte

hinterliessen beim Eindampfen 350 mg eines Öls, das an Silikagel chromatographiert wurde. Mit Chloroform-Methanol eluierte man ein Produkt, welches nach papierchromatographischer Untersuchung einheitlich war, indem es mit dem Fließmittel n-Butanol-6N Salzsäure nur einen Fleck $R_f = 0,70$ lieferte, der sich mit Triphenyltetrazoliumchlorid nachweisen liess. Das Produkt enthielt Chlor-Ionen, aber keine Acetylgruppe. Im IR.-Absorptionsspektrum (in Chloroform) liegen Banden bei 1697(s) und 1770(m) cm^{-1} vor, welche typisch für Succinimide sind¹²⁾. $pK_{\text{MCS}}^* = 5,72$ entspricht einem Hydroxylammonium-Ion. Die gleiche Verbindung konnte unter analogen Hydrolysebedingungen auch aus dem Antibioticum Nocardamin erhalten werden, woraus man schliessen kann, dass sie nur aus Bernsteinsäure und 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan aufgebaut ist.

330 mg des rohen, nicht chromatographierten Produktes nahmen bei der katalytischen Hydrierung mit 38 mg Platinoxid in Methanol 1 Mol Wasserstoff auf. Die Aufarbeitung ergab 296 mg eines farblosen Öls, welches keine Farbreaktion mehr mit Triphenyltetrazoliumchlorid, dagegen eine intensive Violettfärbung mit Ninhydrin gab. $pK_{\text{MCS}}^* = 9,63$ entspricht einem Ammonium-Ion.

$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_2\text{Cl}$ Ber. C 48,94 H 7,76% Gef. C 48,42 H 7,95%

Im IR.-Absorptionsspektrum (flüssig) waren Banden bei 1685(s) und 1765(m) cm^{-1} anwesend, die auf einen Succinimid-Rest hinweisen. Es handelt sich also um das N-(5-Aminopentyl)-succinimid (VIII).

Hydrolyse des Ferrioxamins B ohne vorgehende Entfernung von Eisen(III)-Ionen. Bildung von Hydroxylamin und 1,5-Diaminopentan. 20 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid wurden mit 3 ml 1N Salzsäure im siedenden Wasserbad bis zur Entfärbung (5–10 Min.) erwärmt. Das Hydrolysat wurde zur Trockne eingedampft, mit Wasser versetzt und nochmals zur Trockne verdampft. Die Lösung des Rückstandes in 0,2 ml Wasser wurde papierchromatographisch mit dem Fließmittel n-Butanol-6N Salzsäure (7:3) untersucht. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid liessen sich folgende Flecke nachweisen: R_f 0,17 tiefweinrot (Eisen(II)-Ionen), R_f 0,25 tiefrot (1-Amino-5-hydroxylamino-pentan), R_f 0,34 langsam hellrot (Hydroxylamin), R_f 0,93 rot¹⁸⁾. Das Hydroxylamin liess sich besonders gut als einziger Fleck mit dem Reagens nach CsÁKV¹⁹⁾ entwickeln. Das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan kann man leicht auch mit Ninhydrin entwickeln, dagegen ist das anwesende 1,5-Diaminopentan weitgehend von Eisen(II)-Ionen überdeckt und ist deshalb mit diesem Reagens, mit welchem es sonst einen tiefvioletten Fleck gibt, nicht gut nachweisbar. Für den papierchromatographischen Nachweis von 1,5-Diaminopentan neben 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan mit Ninhydrin wurde deshalb als Fließmittel n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5) verwendet, mit dem beide Verbindungen und das Eisen(II)-Ion gut getrennt werden.

Zur quantitativen Bestimmung von Hydroxylamin, welches bei der sauren Hydrolyse von Ferrioxamin, in Gegenwart von Eisensalzen sowie bei Modellversuchen entsteht, wurde folgendes

NH₂OH-Bestimmungen an Ferrioxamin B, dessen Hydrolyseprodukt, sowie in Modellversuchen

| Untersuchte Substanz | | Äquivalent NH ₂ OH |
|----------------------|--|-------------------------------|
| 55 mg | Ferrioxamin-B-hydrochlorid | 0,70–0,78 |
| 9,5 mg | Tri-acethydroxamat-eisen(III) | 2,7 |
| 55 mg | 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan, 2 HCl | <0,01 |
| 55 mg | 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan, 2 HCl + | |
| 32 mg | (0,5 Äquiv.) Eisen(II)-sulfat, 4 H ₂ O | <0,01 |
| 55 mg | 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan, 2 HCl + | |
| 26,6 mg | (0,33 Äquiv.) Eisen(III)-chlorid, 6 H ₂ O | 0,29 |

¹⁸⁾ Dieser Fleck, der oft bei milden Hydrolysebedingungen beobachtet wurde, entspricht, wie der Vergleich mit einem synthetischen Präparat zeigte, der Verbindung $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{NHOH}$.

¹⁹⁾ I. M. Hais & K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Band 1, Gustav Fischer Verlag, Jena 1958, S. 750.

Verfahren verwendet. Die eingewogenen Substanzen wurden mit 10 ml 1N Salzsäure im siedenden Wasserbad erwärmt. In bestimmten Zeitintervallen wurden Proben von je 1 ml entnommen und auf 20 ml mit Wasser verdünnt. In 1 ml der verdünnten Lösung wurde das Hydroxylamin nach CsÁKY²⁰⁾ kolorimetrisch bestimmt. Die eingewogenen Substanzmengen und die nach 4–5 Std. gefundenen Äquivalente Hydroxylamin sind in einer Tabelle zusammengestellt. Diese Werte waren jeweils schon nach 5–10 Min. nahezu erreicht und stiegen nachher nur noch langsam an.

Zum Nachweis von 1,5-Diaminopentan wurden je 5 mg 1-Amino-5-hydroxylamino-pentandihydrochlorid in 0,5 ml 1N Salzsäure: a) ohne Zusätze, b) mit 2 mg Eisen(II)-sulfat, 4 H₂O, c) mit 2 mg Eisen(III)-chlorid, 6 H₂O 1 Std. auf dem siedenden Wasserbad erwärmt und das Reaktionsprodukt papierchromatographisch mit dem Fließmittel n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5) untersucht. Während ohne Zusätze nur das Ausgangsmaterial gefunden wurde, konnte in Gegenwart sowohl von Eisen(II)-Ionen als auch von Eisen(III)-Ionen neben dem Ausgangsmaterial 1,5-Diaminopentan in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden.

Verhältnis der primären Endprodukte der Hydrolyse im Ferrioxamin B. – Die Anwesenheit eines *Essigsäure*-Restes im Ferrioxamin B folgt direkt aus dem Titrationsergebnis der mit Wasserdampf flüchtigen Säuren nach der sauren Hydrolyse (vgl. S. 2136). Dagegen mussten besondere Versuche unternommen werden, um die Bernsteinsäure und das 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan möglichst vollständig zu erfassen.

Die *Bernsteinsäure* konnte in guter Ausbeute durch alkalische Hydrolyse von Ferrioxamin B erhalten werden. 145 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid löste man in 2 ml Natronlauge. Das ausgefallene Eisen(III)-hydroxyd wurde abzentrifugiert und zweimal mit je 0,6 ml Natronlauge gewaschen. Die vereinigten alkalischen Lösungen wurden 16 Std. im Einschmelzrohr auf 98° erhitzt, worauf man mit 5,8 ml 1N Salzsäure ansäuerte und erschöpfend mit Äther extrahierte. Der Rückstand nach dem Eindampfen des Äthers im Vakuum wog 49 mg (= 1,90 Äquivalente Bernsteinsäure) und lieferte nach Sublimation im Hochvakuum 42 mg (= 1,6 Äquivalente) reine Bernsteinsäure.

Zur Bestimmung von 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan wurde das Ferrioxamin B mit Jodwasserstoffsäure hydrolysiert und das gebildete 1,5-Diaminopentan⁵⁾ mit Ninhydrin kolorimetrisch bestimmt. 12,7 mg Ferrioxamin-B-hydrochlorid wurden im Einschmelzrohr mit 1 ml 56-proz. Jodwasserstoffsäure 10 Std. auf 140° erhitzt. Der Rückstand nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurde in 1 ml Wasser gelöst und mit Äthylacetat ausgeschüttelt, wodurch man den grössten Teil des anwesenden Jods entfernte. Die Äthylacetat-Auszüge wurden mehrmals mit wenig Wasser gewaschen, die wässrigen Lösungen vereinigt und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand löste man in Wasser und füllte genau auf 10 ml auf. Je 1 ml dieser Lösung wurde durch 1 ml Amberlite IRA 400 (frisch bereitete Hydroxylionen-Form) in ein 10 ml Messkölbchen filtriert, nachgewaschen und aufgefüllt. 1 ml der so erhaltenen Lösung (= 127 µg Ferrioxamin-B-hydrochlorid) wurde mit 1 ml Ninhydrin-Reagens²¹⁾ 30 Min. auf 100° erwärmt, nach dem Abkühlen mit 50-proz. Alkohol auf 10 ml aufgefüllt und bei 570 mµ kolorimetriert. Zum Vergleich bereitete man mit reinem 1,5-Diaminopentan eine Eichkurve. Nach diesem Verfahren wurden im Ferrioxamin-B-hydrochlorid im Mittel 2,7 Äquivalente 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan gefunden.

Die Mikroanalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

SUMMARY

Ferrioxamine B, the main sideramine type growth factor isolated from cultures of *Streptomyces pilosus* ETTLINGER *et al.*, is a racemic trihydroxamate-iron(III) complex of the compound IV. The possible configurations for the iron(III) complex are Va–e.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESellschaft,
Pharmazeutische Abteilung, Basel, und
Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

²⁰⁾ T. Z. CsÁKY, Acta chem. scand. 2, 450 (1948).

²¹⁾ S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 907 (1954).