

Untersuchungen an Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen, VI¹⁾

Zur Struktur des Antibiotikums Aldgamycin E

Hans Achenbach* und Wolfgang Karl

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.,
D-7800 Freiburg i. Br., Albertstr. 21

Eingegangen am 6. August 1974

Chemischer Abbau und spektroskopische Untersuchungen führten für Aldgamycin E zum Strukturvorschlag 3.

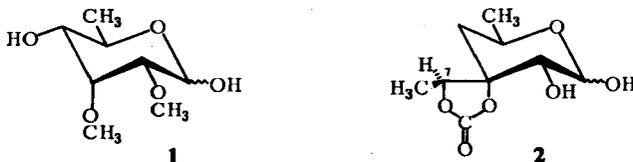
Investigations on Metabolites of Microorganisms, VI¹⁾

On the Structure of the Antibiotic Aldgamycin E

From chemical degradation and spectroscopic investigations we deduce structure 3 for aldgamycin E.

Aldgamycin E (3) wurde 1964 von *Kunstmann et al.*²⁾ aus Kulturen von *Streptomyces lavendulae* (Stamm AL 471) isoliert. Bei der sauren Hydrolyse von 3 fallen — unter Zerstörung des Restmoleküls — die Zucker Aldgarose und Mycinose an³⁾.

Während Mycinose (1) bereits als Zuckerkomponente anderer Antibiotika bekannt war⁴⁾, führten die Strukturarbeiten an Aldgarose zur Formel 2⁵⁾, die kürzlich von *Paulsen et al.*⁶⁾ durch Totalsynthese bestätigt und hinsichtlich der sterischen Anordnung am C-7 präzisiert werden konnte^{6a)}.



Die cyclische Carbonat-Gruppierung und die C₂-Verzweigung der Kohlenstoffkette in 2 sind für einen Naturstoff sehr ungewöhnlich und haben zu biogenetischen Untersuchungen angeregt⁷⁾.

- 1) V. Mitteil.: *H. Achenbach, H. Kohl, H. Reichenbach und H. Kleinig*, Tetrahedron Lett. **1974**, 2555; IV. Mitteil.: *H. Achenbach, H. Strittmatter und W. Kohl*, Chem. Ber. **105**, 3061 (1972).
- 2) *M. P. Kunstmann, L. A. Mitscher und E. L. Patterson*, Antimicrob. Ag. Chemother. **1964**, 87.
- 3) *M. P. Kunstmann, L. A. Mitscher und N. Bohonos*, Tetrahedron Lett. **1966**, 839.
- 4) *H. W. Dion, P. W. K. Woo und Q. R. Bartz*, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 880 (1962).
- 5) *G. A. Ellestad, M. P. Kunstmann, J. E. Lancaster, L. A. Mitscher und G. Morton*, Tetrahedron **23**, 3893 (1967).
- 6) *H. Paulsen und H. Redlich*, Angew. Chem. **84**, 1100 (1972); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **11**, 1021 (1972); Chem. Ber. **107**, 2992 (1974).
- 6a) S. auch: *J. S. Brimacombe, C. W. Smith und J. Minshall*, Tetrahedron Lett. **1974**, 2997.
- 7) *R. Schmid, H. Grisebach und W. Karl*, Eur. J. Biochem. **14**, 243 (1970); *R. Schmid und H. Grisebach*, Z. Naturforsch. **25B**, 1259 (1970).

In der vorliegenden Arbeit wird über die Struktur des Aglycons berichtet, über die bisher noch nichts bekannt war.

Es standen insgesamt nur 400 mg Aldgamycin E zur Verfügung, die durch Fermentation von *S. lavendulae* gewonnen worden waren. Im Zuge der Aufarbeitung der Kulturansätze fiel bei der säulenchromatographischen Reinigung auch ein neues Antibiotikum an, das wir wegen seiner physikalisch-chemischen Ähnlichkeit mit **3** als Aldgamycin F bezeichnen. Über die Struktur von Aldgamycin F soll später berichtet werden.

Die bereits von *Kunstmann* et al. angegebene Elementarzusammensetzung von **3** wird durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt (M^+ : 742.3784, $C_{37}H_{58}O_{15}$). Die massenspektrometrische Fragmentierung von **3** ist in Übereinstimmung mit einer Makrolid-Struktur. Die beobachteten Schlüsselfragmente erlauben folgende Rückschlüsse auf die Struktur⁸⁾:

1) **3** enthält neben Mycinoose und Aldgarose keine weiteren Zuckerkomponenten. Die beiden erwähnten Zucker liegen nicht in disaccharidischer Anordnung vor.

2) Für das präparativ nicht zugängliche Aglycon (formale Hydrolyse der glycosidischen Bindungen) ermittelt man die Elementarzusammensetzung $C_{20}H_{36}O_6$. Wie die massenspektrometrische Untersuchung in Verbindung mit H/D-Austauschexperimenten zeigt, enthält das Aglycon keine freien Hydroxyl-Gruppen.

Im Elektronen-Spektrum von **3** läßt sich das Maximum bei 216 nm ($\epsilon = 22500$) einer α,β -ungesättigten Acyl-Gruppierung zuordnen, während das schwache Maximum bei 285 nm ($\epsilon \approx 150$) für nicht-konjugierte Ketone typisch ist.

Erwartungsgemäß verschwindet das kurzwellige Maximum nach Hydrierung an Pd/Kohle. Da unter diesen Bedingungen nur ein einheitliches Dihydro-Produkt entsteht, ist die Anwesenheit einer weiteren hydrierbaren $C=C$ -Doppelbindung in **3** auszuschließen.

3 enthält auch keine zweite Keton-Gruppierung, denn die Umsetzung mit $NaBH_4$ führt zum Aldgamycinol E (M^+ 744, λ_{max} 216 nm, kein λ_{max} bei 285 nm), das im Aglycon nur eine Hydroxyl-Gruppe trägt. Unter Berücksichtigung der Gesamtzahl von 6 Sauerstoffatomen im Aglycon (s. o.) sollte noch ein Sauerstoffatom in einer Äther-Anordnung vorliegen.

Daher und im Hinblick auf den Makrolid-Charakter von **3** muß es sich bei der α,β -ungesättigten Acyl-Gruppe um das Makrolid-Lacton handeln.

Informationen über die Umgebung der Lactongruppierung lassen sich 1H -NMR-spektroskopisch gewinnen: Man erkennt die Signale von zwei olefinischen Protonen, die an der zum Lactoncarbonyl α,β -ständigen Doppelbindung zu lokalisieren sind (Abb. 1). Sie erscheinen als AB-System ($\delta = 6.72$ ppm, $J = 15.5$ Hz, und 5.86, $J = 15.5$ Hz), wobei der B-Teil zu einem weiteren Dublett ($J = 10.5$ Hz) aufgespalten ist.

Durch Einstrahlung bei $\delta = 2.75$ ppm — einem für allylständige Methin- und Methylen-Protonen üblichen Bereich — wird das Doppeldublett bei 6.72 zum Dublett

⁸⁾ H. Achenbach und W. Karl, Chem. Ber. **108**, 772 (1975), nachstehend.

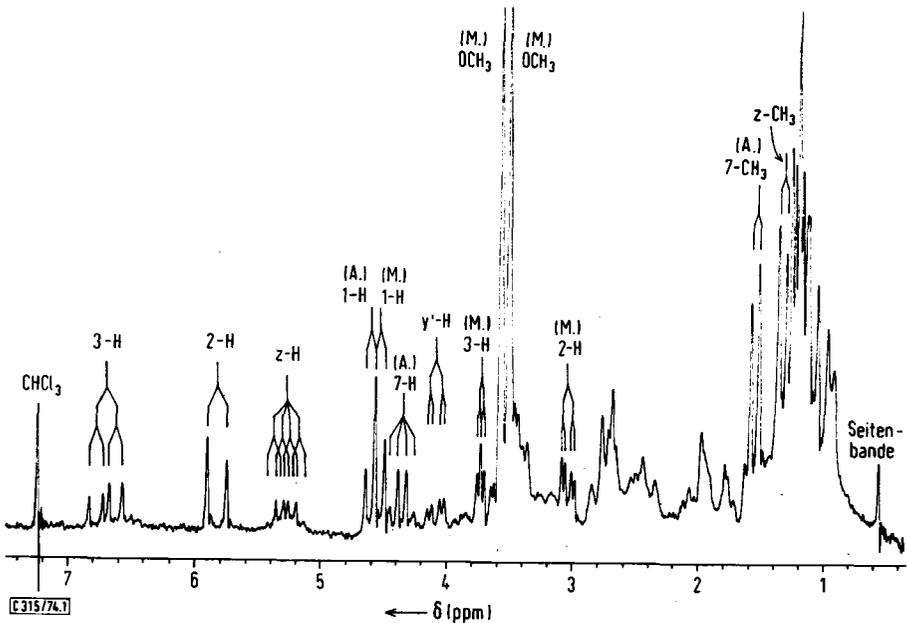


Abb. 1. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Aldgamycin E (3) (100 MHz)
M.: Signal aus Mycinosyl; A.: Signal aus Aldgarosyl

vereinfacht; gleichzeitig kollabiert auch das Methyl-Dublett bei 1.20 ($J = 6.5$ Hz) zum Singulett, und schließlich wird noch die große Kopplungskonstante ($J_{\max} = 10.5$ Hz) eines verbreiterten Dubletts bei 3.45 aufgehoben.

Wie ein Vergleich mit den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Methyl-glycoside von Aldgarose und Mycinose zeigt, müssen diese Signale dem Aglycon zugeordnet werden. Sie gestatten die Festlegung des Strukturelementes **a**.

Das Proton, das sich in α -Stellung zum Ring-Sauerstoff befindet, erscheint bei besonders tiefem Feld ($\delta = 5.31$ ppm) und in hoher Multiplizität, die als Dublett ($J = 9.5$ Hz) eines Quartetts ($J = 6.2$ Hz) zu analysieren ist (Abb. 2a). Durch Einstrahlungsexperimente läßt sich zeigen, daß das zugehörige CH_3 -Dublett bei 1.35 ($J = 6.2$ Hz) zentriert ist. Einstrahlung bei der Frequenz dieser Methyl-Gruppe bringt ein überraschendes Ergebnis (Abb. 2b): Das Multipllett bei 5.31 erscheint jetzt nicht zum Dublett, sondern zum Singulett vereinfacht. Diese Situation fordert, daß auch das für die Verdoppelung des Quartetts verantwortliche Proton im eingestrahlten Bereich – also unter den C- CH_3 -Signalen – zu lokalisieren ist.

Wie Abb. 2 zeigt, kommt es bei diesem Entkopplungsexperiment noch zu einer weiteren Vereinfachung: Ein Doppeldublett ($\delta = 4.12$ ppm, 1H, $J_1 = 10$, $J_2 = 3.8$ Hz) vereinfacht sich zum Dublett ($J = 10$ Hz). Diese Signalgruppe ist als A-Teil eines ABX-Systems zu interpretieren, dessen B-Teil von den Methoxyl-Resonanzen überdeckt wird, während der X-Teil im Bereich der eingestrahlten Frequenz liegt.

In Übereinstimmung mit dieser Interpretation verschwindet durch Einstrahlung bei $\delta = 3.60$ ppm (Zentrum des B-Teils) die große Kopplung des A-Teils, aus dem ein

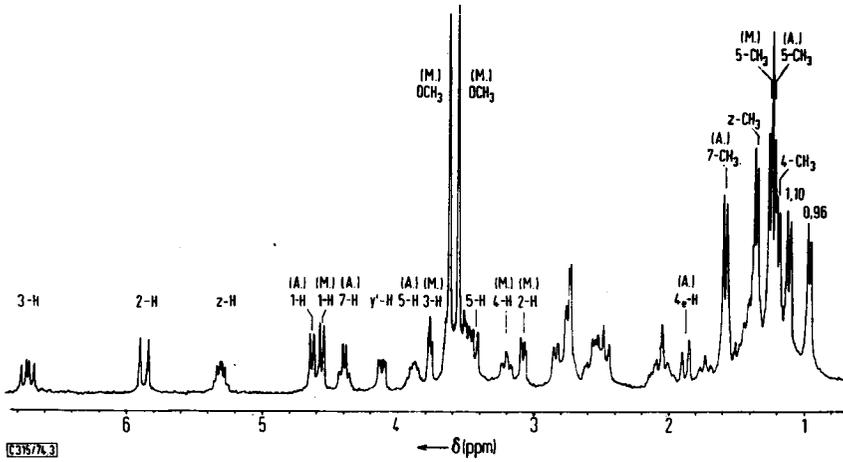


Abb. 3. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Aldgamycin E (3) (270 Hz)
M.: Signal aus Mycinosyl; A.: Signal aus Aldgarosyl

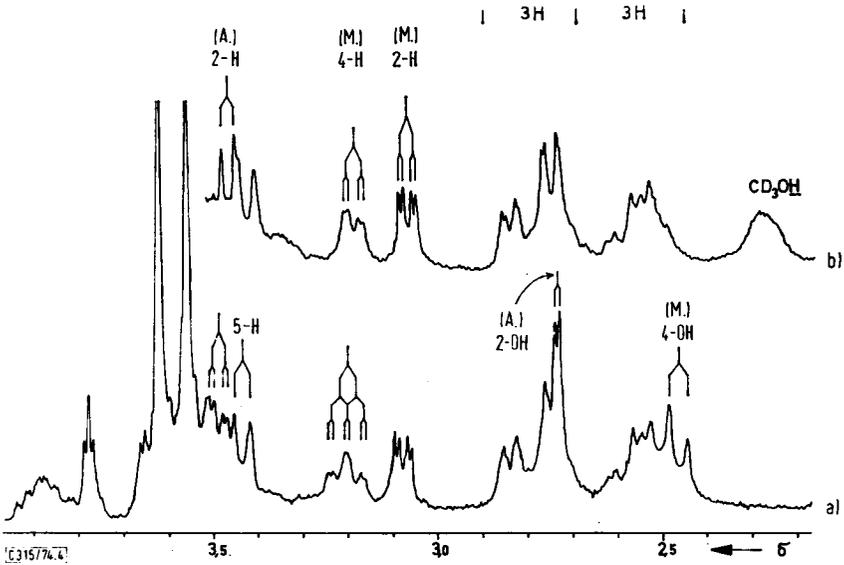


Abb. 4. Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3 (270 MHz)
a) in CDCl_3 ; b) in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$

Resonanzen der zum Keton α -ständigen Protonen sind bei $\delta = 2.5$ ppm (Integral: 3 H) zu erwarten. Durch Einstrahlung bei dieser Frequenz (2.55) kommt es zu folgenden Vereinfachungen (Abb. 5):

1. Das Methyldoublett ($\delta = 1.11$ ppm) vereinfacht sich zum Singulett.
2. Ein kompliziertes Multipllett ($\delta = 2.04$ ppm, 2H) vereinfacht sich zu einem symmetrischen Sextett.

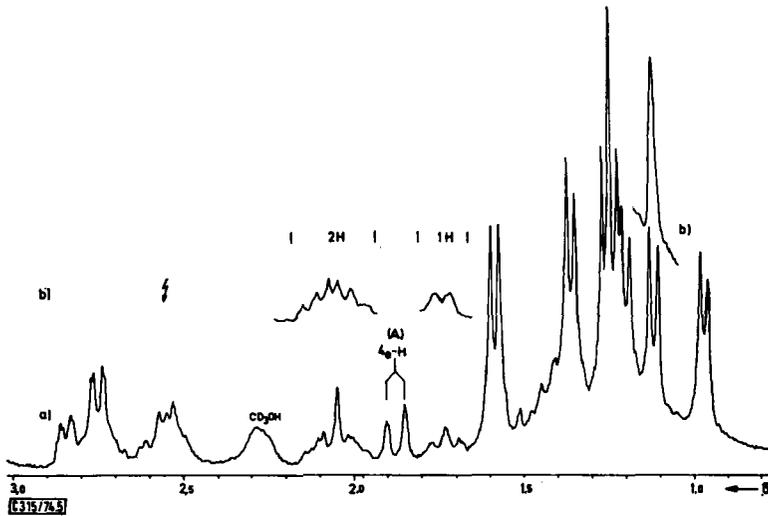


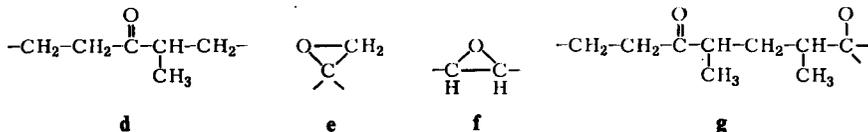
Abb. 5. Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von **3** (270 MHz)
a) ohne Einstrahlung; b) Einstrahlung bei $\delta = 2.55$ ppm

3. Ein verbreitertes Triplet ($\delta = 1.73$ ppm, 1 H, $J = 11$ Hz) vereinfacht sich zum Dublett ($J = 11$ Hz).

Da Einstrahlversuche bei den unter 2. und 3. genannten Frequenzen (= zum Keton β -ständige Protonen) *keine* Veränderungen von C-CH₃-Signalen bewirken, kann die Umgebung des Ketons als **d** formuliert werden.

Der von der Resonanz des allylischen Protons überlagerte Signalhaufen von $\delta = 2.7$ bis 2.9 ppm läßt sich analysieren als zwei Doppeldubletts mit Zentren bei $\delta = 2.84$ (1 H, $J = 9$ und 2 Hz) und 2.74 ppm (1 H, $J = 8$ und 2 Hz). Für die chemische Verschiebung dieser beiden Protonen sollte die Nachbarschaft zur — bisher noch nicht festgelegten — Ätherfunktion verantwortlich sein.

Diese Resonanzfrequenzen sind typisch für Epoxid-Gruppierungen⁹⁾. Eine Spiro-Anordnung **e** läßt sich ausschließen, da in diesem Falle ein scharfes AB-System mit $J \approx 6$ Hz erscheinen sollte¹⁰⁾.



Das Strukturelement eines 1,2-disubstituierten Oxirans **f** ist mit den ^1H -NMR-Daten in voller Übereinstimmung; die beobachtete Kopplungskonstante von 2 Hz entspricht der Kopplung der beiden Methinprotonen¹⁰⁾.

⁹⁾ H. Suhr, Anwendungen der kernmagnetischen Resonanz in der organischen Chemie, S. 205, Springer Verlag, Heidelberg 1965.

¹⁰⁾ A. A. Bothner-By, Advan. Magn. Resonance **1**, 195 (1965).

Oxidativer Abbau

a) *Oxidation von 3*: Da selektive Oxidationsmethoden am Aldgamycin E keinen Angriffspunkt finden, mußte auf die Oxidation mit Salpetersäure oder CrO_3 zurückgegriffen werden. Im Hinblick auf die Unterdrückung von Nebenreaktionen wurde dem Abbau mit CrO_3 in Essigsäure der Vorzug gegeben. Es war zu erwarten, daß die oxidative Spaltung bevorzugt an der Keto-Gruppe angreift. Für die Gewinnung geeigneter Bruchstücke sind optimale Reaktionszeiten und -temperaturen wesentlich, die experimentell ermittelt werden müssen¹¹⁾.

Aus den Mikroansätzen wurden die entstandenen Säuren in der üblichen Weise extrahiert und nach Veresterung mit Diazomethan gaschromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht.

Wie Abb. 6 zeigt, fallen unter den ausgearbeiteten Bedingungen in erstaunlicher Spezifität nur zwei Säuren als Hauptkomponenten an, die als 2,4-Dimethylglutarsäure (= Methylester A) und 2,3-Dimethoxybernsteinsäure (= Methylester B) identifiziert wurden.

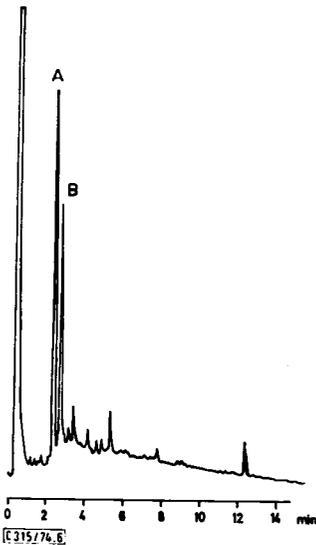


Abb. 6 (links). Gaschromatogramm des Methylestergemisches nach Oxidation von **3** ($80^\circ\text{C} \rightarrow 280^\circ\text{C}$; $15^\circ\text{C}/\text{min}$)

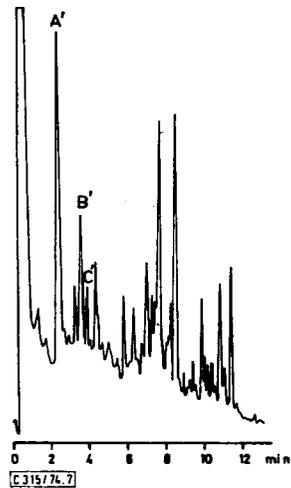


Abb. 7 (rechts). Gaschromatogramm des Methylestergemisches aus der Oxidation der Polyol diglycoside ($60^\circ\text{C} \rightarrow 240^\circ\text{C}$; $15^\circ\text{C}/\text{min}$)

Der gaschromatographische Vergleich mit synthetisiertem Material erlaubte die Aussage, daß die 2,4-Dimethylglutarsäure in der *meso*-Konfiguration vorliegt, die im Gegensatz zu Literaturangaben¹²⁾ unter den verwendeten Bedingungen eine größere Retentionszeit als die *d*- bzw. *l*-Form besitzt.

¹¹⁾ S. z. B.: S. Bergström, R. Ryhage, B. Samuelson und S. Sjövall, Acta Chem. Scand. **17**, 2271 (1963).

¹²⁾ H. G. Clark, Makromol. Chem. **86**, 107 (1965).

Während 2,3-Dimethoxybernsteinsäure ein Abbauprodukt der Mycinoose (**1**) sein muß, kann 2,4-Dimethylglutarsäure nur aus dem strukturell noch nicht ganz abgeklärten „mittleren“ Teil des Aglycons entstanden sein.

Die beiden C-Methyl-Gruppen, die im Zuge der Oxidation in die Dimethylglutarsäure eingegangen sind, müssen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Aldgamycin E den Resonanzen bei $\delta = 1.10$ und 0.96 ppm zugeordnet werden. Die Befunde erlauben eine Erweiterung des Strukturelementes **d** zu **g**.

b) *Oxidation nach Reduktion von 3 mit LiAlH_4* : Da Epoxide mit LiAlH_4 reduktiv geöffnet werden, sollten im Zuge dieser Reaktion neue Angriffspunkte für eine Oxidation mit CrO_3 entstehen und zur Bildung entsprechender Säuren führen.

Bei der Reduktion von **3** mit LiAlH_4 *) fällt ein Gemisch von Polyol-diglycosiden mit den Mol.-Massen 724 (= Octahydro-Verbindung) und 726 (= Decahydro-Verbindung) an, da neben der Reaktion an Lacton-, Keton- und Epoxid-Gruppierung teilweise auch die Doppelbindung des α,β -ungesättigten Lactons abgesättigt wird¹³⁾. Zur Oxidation wurde das Rohprodukt der LiAlH_4 -Reduktion eingesetzt.

Unter milden Oxidationsbedingungen (30 min/80°C) erhält man ein kompliziertes Gemisch von Säuren, deren Methylester das in Abb. 7 wiedergebene GC liefern.

Die leichtflüchtigen Komponenten wurden als die Methylester von Bernsteinsäure (A'), 2-Methylglutarsäure (B') und 2,4-Dimethylglutarsäure (C') identifiziert.

Besondere Bedeutung kommt der Isolierung von Bernsteinsäure als Hauptkomponente zu, die nur nach LiAlH_4 -Reduktion anfällt und aus den bisher festgelegten Strukturelementen nicht erklärt werden kann. Ihre Bildung muß daher mit der Öffnung der Epoxid-Funktion in Zusammenhang stehen.

Die Entstehung von 2-Methylglutarsäure ist nach Reduktion der C=C-Doppelbindung aus den C-Atomen C-1 bis C-5 (siehe **b**) zu erwarten.

Unter Berücksichtigung der $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Befunde ist die Erweiterung des Strukturelementes **g** zu **h** gerechtfertigt.

Bei der reduktiven Öffnung des Epoxids mit LiAlH_4 ist bemerkenswert, daß die sekundäre Alkohol-Gruppe offensichtlich bevorzugt in γ' -Stellung zur ursprünglichen Ketogruppe gebildet wird. Eine Alkohol-Funktion in δ' -Stellung sollte als Oxidationsprodukt Glutarsäure liefern, die als Abbauprodukt aber nicht nachweisbar war. Bei 1,2-Dialkyloxiranen besteht in der Regel keine bevorzugte Öffnungsrichtung¹⁴⁾; wir nehmen an, daß beim Aldgamycin E sterische Gründe für den einheitlichen Verlauf der LiAlH_4 -Reduktion verantwortlich sind.

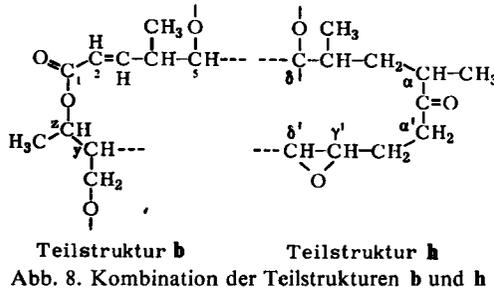
Der „mittlere“ Teil des Aglycons (**b** (S. 762): $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_2$) umfaßt 10 Kohlenstoffatome. Mit **h** sind über diesen Teil des Aglycons hinaus 11 Kohlenstoffatome festgelegt. Ein endständiges Kohlenstoffatom in **h** muß also mit einem endständigen Kohlenstoffatom in **b** identisch sein.

Diese Forderung wird nur durch C-5 erfüllt, das mit C- δ identisch ist (Abb. 8).

*) Im Zuge dieser Umsetzung wird auch die cyclische Carbonat-Gruppe der Aldgarose entfernt.

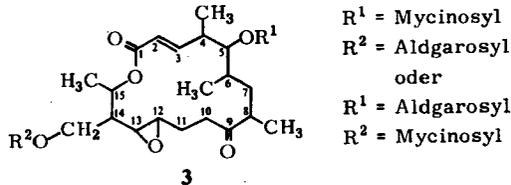
¹³⁾ E. F. Jenny und C. A. Grob, *Helv. Chim. Acta* **36**, 1942 (1953).

¹⁴⁾ A. Hajos, *Komplexe Hydride*, S. 149, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1966.



Denn eine Identität von C-5 mit C- δ' ist auszuschließen, da für 5-H eine chemische Verschiebung von $\delta = 3.45$ ppm ermittelt wurde, die erheblich von den Resonanzfrequenzen der Epoxid-Protonen abweicht.

Für Aldgamycin E ergibt sich damit die Konstitution 3, wobei die Stellung der beiden Zucker zunächst noch offenbleiben muß.



Bezüglich der sterischen Anordnung lassen sich folgende Aussagen machen:

1. Die große Kopplungskonstante der olefinischen Protonen beweist die *trans*-Orientierung an der C=C-Doppelbindung.
2. Die relative Konfiguration an C-6 und C-8 entspricht einer *meso*-Anordnung wegen der Isolierung von *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure aus diesem Teil des Moleküls.
3. Die großen Kopplungskonstanten der Anomeren-Protonen (Abb. 1 und 3) zeigen β -glycosidische Verknüpfung für beide Zucker an¹⁵⁾.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemie* für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachbeihilfen.

Experimenteller Teil

Schmelzpunkte: Kofler-Heiztischmikroskop (Fa. Reichert), unkorrigiert; IR-Spektren: KBr-Preßlinge, Perkin-Elmer 457; UV-Spektren: in Methanol p. a., Spektralphotometer DMR 21 (Fa. Zeiss); $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: Geräte HA 100 (Fa. Varian) und HX 270 (Fa. Bruker-Physik). Soweit nicht anders vermerkt, wurde Deuteriochloroform als Lösungsmittel verwendet. Innerer Standard: Tetramethylsilan.

Massenspektren: CH-4-Massenspektrometer (Fa. Varian-MAT), Ionenquelle TO 4, Ionisierungsenergie 70 eV, Einlaß der Substanzen je nach Flüchtigkeit über Ofenschleuse oder MOL-Einlaß. Für Substanzen mit Mol.-Massen über 600 wurde ein doppeltfokussierendes Massenspektrometer vom Typ SM 1 B (Fa. Varian-MAT) bei einer Auflösung von $M/\Delta M$

¹⁵⁾ R. U. Lemieux und J. D. Stevens, *Can. J. Chem.* **44**, 249 (1966).

= 1000 benutzt; Ionenquelle: EH 1, Ionisierungsenergie 70 eV, Temp. der Ionenquelle 180°C, Einlaßsystem: Schubstange; Probentemp. 150–200°C. Die hochaufgelösten Daten bestimmten wir mit dem SM 1-B nach der „Peak-matching“-Methode bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 14000$ (10% Tal).

Gaschromatographie: Gerät 5750 (Fa. Hewlett & Packard), Detektor: WLD, 2-m-Säulen aus Glas (1/8") mit 2% SE 30 auf Chromosorb W (AW-DMCS 60/80 mesh). Trägergas: He (ca. 100 ml/min), Temperaturen: Einspritzblock 230°C, Detektor 300°C.

Dünnschichtchromatographie: Kieselgel H (Fa. Merck), Schichtdicke 0.25 mm. Nach Lufttrocknung erfolgte die Aktivierung bei 105°C/30 min. Für die präparative DS-Chromatographie wurden die Platten vor der Aktivierung nacheinander in Methanol und Chloroform/Methanol (90:10) gewaschen. Detektion mit Joddampf, durch Besprühen mit 10proz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 130°C sowie mit dem Fluoreszenzindikator F₂₅₄ (Fa. Merck).

Züchtung von Streptomyces lavendulae AL 471: Die Züchtung erfolgte in Anlehnung an l. c.¹⁶⁾.

a) *Sporulationsmedium:* 20 g italienisches Tomatenmark, 20 g Milupa-Haferflocken und 20 g Difco Bacto Agar werden in 1 Liter Leitungswasser gelöst und mit Natronlauge auf pH 9.3 eingestellt. Nach 20 min Sterilisieren bei 120°C ist der pH-Wert auf 7.3 abgesunken. Der flüssige Agar wird in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wird der Organismus¹⁷⁾ mit Hilfe einer Platinöse auf der Oberfläche verteilt. Nach einer Woche bei 28°C ist ein dichtes, graublaueres Luftmycel angewachsen. Etwa alle 3 Monate wird neu überimpft.

b) *Submers-Vorkulturen:* 5 g Difco Nutrient Broth, 5 g Difco Bacto Tryptone, 5 g Natriumchlorid und 2.6 g Kaliumhydrogenphosphat · 3 H₂O werden in 920 ml Wasser gelöst. Dazu gibt man 3 g Magnesiumsulfat · 7 H₂O, 150 mg Eisen(II)-sulfat · 7 H₂O, 50 mg Zink(II)-sulfat · 7 H₂O und 50 mg Mangan(II)-sulfat · H₂O, in jeweils 10 ml Wasser gelöst, und stellt anschließend auf pH 7.6 ein. Je 230 ml dieses Nährmediums werden in vier 1-Liter-Erlenmeyer-Kolben abgefüllt, die vier 1 cm tiefe Einkerbungen tragen. 10 g Glucose (Fa. Maizena) werden in 80 ml dest. Wasser gelöst und zusammen mit der oben genannten Nährlösung 20 min bei 120°C sterilisiert. Jeder Kolben wird mit 20 ml Glucoselösung steril versetzt und mit einer Platinöse voll Luftmycel beimpft. Die Inkubation erfolgt auf einer Rotationsschüttelmaschine (Typ G-25, New Brunswick Scientific) bei 30°C und 180 U/min.

c) *Submers-Hauptkulturen:* Die 10fache Menge der Nährlösung für Vorkulturen wird in einem 10-Liter-Fermenter (Typ FS-314, New Brunswick Scientific) 20 min bei 120°C sterilisiert und mit einer ebenfalls sterilen Lösung von 100 g Glucose in 800 ml dest. Wasser versetzt. Zwei (= 500 ml) der 48 h alten Vorkulturen werden steril überimpft, und der Fermenter bei 30°C und 220 U/min inkubiert. Die Probenahme für den Diffusionsplattentest erfolgte ca. alle 12 h. Der Agardiffusionsplattentest wurde mit getränkten Papierscheibchen gegen *B. subtilis* in der üblichen Weise durchgeführt. Als Standard diente eine Chalconycin-Verdünnungsreihe.

Aufarbeitung der Hauptkulturen: Im Durchschnitt erreichte die Antibiotikakonzentration nach ca. 48 h ein Maximum (ca. 12 µg/ml). Zu diesem Zeitpunkt wird die Fermentation abgebrochen und das Mycel mit einer Durchlaufzentrifuge (Westphalia Typ LWA-205) abgetrennt. Das Filtrat wird mit 2.5 Liter frisch dest. Chloroform durch hochtouriges Rühren emulgiert und die Emulsion mit einer Phasentrennzentrifuge (Westphalia Typ LWA-205) getrennt.

¹⁶⁾ H. Grisebach und R. Schmid, Privatmitteil.

¹⁷⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Grisebach, Freiburg, für die Überlassung der Sporen.

Dieser Vorgang wird mit der anfallenden wäßr. Phase wiederholt. Die mit Natriumsulfat getrockneten vereinigten Chloroformauszüge werden i. Vak. zur Trockne eingengt. Aus 15 Ansätzen (je 10 Liter Hauptkultur) erhielten wir insgesamt 18 g Chloroform-Extrakt.

Chromatographische Trennung — Isolierung von Aldgamyacin E

a) *Trennung an Sephadex LH 20*: 3.6 g Chloroform-Extrakt wurden auf 85 g Sephadex LH 20 (\varnothing 25 mm) gegeben und mit Methanol/Chloroform (70:30) in 30 Fraktionen (je 10 ml) aufgetrennt. Nach DC-Prüfung (Chloroform/Methanol 90:10; Detektion: 10proz. Schwefelsäure — Erhitzen auf 130°C) erfolgte Vereinigung zu drei Hauptfraktionen:

Fraktion:		Rückstandsgewicht:
1—4	Vorlauf	1.62 g
5—23	antibiotische Fraktion F ₁	1.26 g
24—30	Nachlauf	0.73 g

Die antibiotische Fraktion F₁ wurde in zwei Anteilen (je 630 mg) erneut an 85 g Sephadex LH 20 mit Methanol/Chloroform (70:30) chromatographiert. Es wurden 55 Fraktionen (je 5 ml) aufgefangen und nach DC-Prüfung entsprechend vereinigt:

Fraktion:		Rückstandsgewicht:
1—4	Vorlauf	65 mg
5—27	antibiotische Fraktion F ₂	310 mg
28—55	Nachlauf	255 mg

Der Nachlauf enthielt Diketopiperazine. Die entsprechende Aufarbeitung des gesamten Chloroform-Extraktes ergab 3.15 g antibiotische Fraktion F₂.

b) *Trennung an Kieselgel*: 315 mg antibiotische Fraktion F₂ wurden auf eine Säule (\varnothing 18 mm) mit 100 g Kieselgel (Fa. Mallinckrodt) gegeben und in 160 Fraktionen (je 2 ml) aufgetrennt. Eluiert haben wir in der nachstehenden Reihenfolge mit: 50 ml Chloroform; 100 ml Chloroform/Methanol (99:1); 150 ml Chloroform/Methanol (98:2) und 50 ml Methanol. Bei der DC-Prüfung (Chloroform/Methanol 90:10; Detektion: 10proz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 130°C) erscheinen Aldgamyacin E mit R_F 0.62 (gelber Fleck) und Chalcomycin/Aldgamyacin F mit R_F 0.53 (roter Fleck).

Die wesentlichen Fraktionen wurden wie folgt vereinigt:

Fraktion:		Rückstandsgewicht:
85—91	Aldgamyacin E (roh)	75 mg
92—93	Aldgamyacin E/Chalcomycin	12 mg
94—99	Chalcomycin u. Verunreinigungen (u. Aldgamyacin F)	62 mg

Durch entsprechende Auftrennung erhielten wir aus 3.15 g antibiotischer Fraktion F₂ insgesamt 710 mg rohes Aldgamyacin E, 130 mg Aldgamyacin E/Chalcomycin-Gemisch und 630 mg Chalcomycin/Aldgamyacin F-Gemisch.

Das rohe Aldgamyacin E wurde in wenig Methanol gelöst und mit Diäthyläther versetzt. Es fallen 340 mg sehr feine Nadeln vom Schmp. 156—159°C (Lit.²⁾ 158—160°C) aus.

Die eingengte Mutterlauge (350 mg) und 130 mg Aldgamyacin E/Chalcomycin-Gemisch wurden an 100 g Kieselgel rechromatographiert. Aus den Aldgamyacin E enthaltenden Fraktionen kristallisierten mit Methanol/Wasser 40 mg rechteckige Plättchen vom Schmp. 164 bis 166°C (Lit.²⁾ 173—178°C).

MS: $M^+ = 742.3784$ (ber. 742.3775 für C₃₇H₅₈O₁₅). — IR: ν_{CO} 1800 und 1710 cm⁻¹. — UV: λ_{max} 216 nm ($\epsilon = 22500$) und 285 nm ($\epsilon \approx 150$)

Mono- und Diacetylaldgamycin E: 10 mg Aldgamycin E wurden in einer Mischung aus 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Acetanhydrid 12 h bei Raumtemp. stehengelassen. Das Reaktionsprodukt wurde durch DC (Chloroform/Methanol 97:3) in zwei Komponenten aufgetrennt. Man erhielt 7.5 mg Monoacetylaldgamycin E ($M^+ = 784$; R_F 0.60) und 2 mg Diacetylaldgamycin E ($M^+ = 826$; R_F 0.73).

2 mg Monoacetylaldgamycin E, in 0.5 ml Acetylierungsgemisch gelöst, ergaben nach 70 h in nahezu quantitativer Ausb. das Diacetylderivat.

Aldgamycinol E und Aldgamycinol C (Borhydrid-Reduktion): 10 mg Aldgamycin E in 1 ml absol. Äthanol p. a. wurden zur Lösung von 3 mg Natriumborhydrid puriss. (Fluka) in 1 ml absol. Äthanol p. a. gegeben. Man ließ über Nacht stehen und leitete dann trockenes CO_2 ein. Der sich bildende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat i. Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand mit Chloroform ausgezogen und i. Vak. eingengt. Durch präparative DC (Chloroform/Methanol 90:10) erhielt man 6 mg Aldgamycinol E ($M^+ = 744$; R_F 0.48; UV: λ_{max} 216 nm) und 2.5 mg Aldgamycinol C ($M^+ = 718$; R_F 0.30; UV: λ_{max} 216 nm).

Dihydroaldgamycin E: 8 mg Aldgamycin E wurden in 1 ml Methanol p. a. an 3 mg Palladium/Kohle 4 h hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. eingengt, wobei 7.5 mg Dihydroaldgamycin E anfielen ($M^+ = 744$; R_F 0.65 mit Chloroform/Methanol 95:5; UV: kein λ_{max} bei 216 nm).

Oxidation von Aldgamycin E mit Chrom(VI)-oxid: 10 mg Aldgamycin E in 2 ml 95proz. Essigsäure wurden mit 100 mg Chrom(VI)-oxid p. a. versetzt. Man hielt 1.5 h bei 80°C und zerstörte anschließend überschüss. Oxidationsmittel mit Methanol. Die Hauptmenge Essigsäure wurde i. Vak. bei 50°C abgezogen und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Nach Ansäuern mit verd. Salzsäure auf pH 3 wurde mit Diäthyläther im Perforator extrahiert und der Ätherextrakt mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels nahm man den Rückstand mit wenig Methanol auf und versetzte mit äther. Diazomethanlösung. Das Gemisch der Methylester wurde durch präparative GC (Temperaturprogramm: 80°C → 290°C – 15°C/min) unter Standardbedingungen getrennt. Die reinen Ester wurden massenspektrometrisch untersucht. Durchbruchstemperaturen:

Peak A (= *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester): 118°C, Peak B (= *meso*-2,3-Dimethoxybernsteinsäure-dimethylester): 121°C.

Reduktion von Aldgamycin E mit Lithiumaluminiumhydrid: 20 mg Aldgamycin E wurden in 3 ml absol. Tetrahydrofuran mit 30 mg Lithiumaluminiumhydrid 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von etwas Essigsäure-äthylester erhitzte man weitere 30 min, versetzte anschließend unter Eiskühlung mit gesätt. Seignettesalz-Lösung, extrahierte mehrmals mit Essigsäure-äthylester, engte die getrockneten organischen Extrakte i. Vak. ein und erhielt 20.5 mg Polyol-diglycosid: $M^+ 726$ und 724.

Oxidation des Polyol-diglycosids mit Chrom(VI)-oxid: 10 mg Polyol-diglycosid wurden in 2 ml Essigsäure mit 100 mg Chrom(VI)-oxid 30 min bei 80°C oxidiert und – wie oben beschrieben – weiterverarbeitet. Das entstandene Methylestergemisch wurde durch präparative GC (Temperaturprogramm: 60°C → 250°C – 15°C/min) unter Standardbedingungen getrennt. Die reinen Ester wurden massenspektrometrisch untersucht. Durchbruchstemperaturen:

Peak A' (= Bernsteinsäure-dimethylester): 93°C.

Peak B' (= 2-Methylglutarsäure-dimethylester): 112°C.

Peak C' (= *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester): 117°C.

¹⁸⁾ K. Ruhl, Z. Naturforsch. 4B, 199 (1949).

Vergleichssubstanzen

a) *2,4-Dimethylglutarsäure (Gemisch der Diastereoisomeren)*: 23.8 g Methylmálonsäure-diäthylester wurden mit 15.8 g Methacrylsäure-äthylester nach l. c.¹⁸⁾ kondensiert und verseift. Ausb. 13.2 g, Schmp. 102 – 105°C (Lit.¹⁸⁾ 105–108°C).

b) *Trennung der Diastereoisomeren über die Ester*: 13.2 g 2,4-Dimethylglutarsäure (Stereoisomeren-Gemisch) wurden in 100 ml 1 M-methanolischer Schwefelsäure unter Feuchtigkeitsausschluß 5 h unter Rückfluß erhitzt. Danach destillierte man die Hauptmenge des Methanols ab und gab den Rückstand auf die fünffache Menge Eiswasser. Die organische Schicht wurde abgetrennt und die wäbr. Phase mehrmals ausgeäthert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Soda-Lösung entsäuert, mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an einer Mikrodrehbandkolonne mit ca. 40 theoretischen Böden bei einem Rücklaufverhältnis von 1:50 getrennt. Es fielen an:

3.3 g D,L-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester, Sdp. 90.0 bis 90.5°C/12 Torr; GC-bestimmte Stereo-Reinheit: 95%, und 3.6 g Gemisch der diastereoisomeren Ester, Sdp. 90.5 bis 91°C/12 Torr. Die Redestillation des Rückstandes (5.1 g) ergab 4.4 g *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester, Sdp. 91.0–91.5°C/12 Torr; GC-bestimmte Stereo-Reinheit: 95%.

c) *Verseifung der Ester*: 4.4 g *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester wurden mit 15 g KOH in 15 ml Wasser und 30 ml Äthanol 4 h unter Rückfluß erhitzt und anschließend die Hauptmenge Äthanol i. Vak. abgezogen. Der Rückstand wurde mit wenig Wasser versetzt und unter Eiskühlung mit konz. Salzsäure auf pH 1 gebracht. Man ätherte mehrmals aus, wusch die vereinigten Äther-Extrakte mit Wasser, trocknete mit Magnesiumsulfat und engte i. Vak. zur Trockne ein. Es fielen an: 3.4 g *meso*-2,4-Dimethylglutarsäure, Schmp. 142–143°C (aus Äther) (Lit.¹⁹⁾ 142.5–143.5°C).

3.3 g D,L-2,4-Dimethylglutarsäure-dimethylester wurden in analoger Weise verseift und ergaben: 2.6 g D,L-2,4-Dimethylglutarsäure, Schmp. 127–128°C (aus Äther) (Lit.¹⁹⁾ 128°C).

d) *Spaltung in optische Antipoden*: 2.6 g D,L-Säure wurden mit 7.0 g (–)-Brucin · 2 H₂O nach l. c.²⁰⁾ in die optischen Antipoden getrennt. Man erhielt: 110 mg D-(+)-2,4-Dimethylglutarsäure, Schmp. 76–79°C (Lit.²⁰⁾ 79.5–80°C), $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$ ($c = 0.5$ in CHCl₃) (Lit.²⁰⁾ +40.2°, $c = 1.2$ in CHCl₃) und

95 mg L-(–)-2,4-Dimethylglutarsäure, Schmp. 75.5–78.5°C (Lit.²⁰⁾ 79.5–80°C), $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ ($c = 0.46$ in CHCl₃) (Lit.²⁰⁾ –40.2°, $c = 1,2$ in CHCl₃)

e) L-(+)-2,4-Dimethoxybernsteinsäure-dimethylester: 4.5 g L-(+)-Weinsäure-dimethylester wurden in Anlehnung an l. c.²¹⁾ mit 20 g Methyljodid und 30 g Silberoxid zum Dimethyläther umgesetzt. Nach Aufarbeitung und Destillation Ausb. 4.2 g, Sdp. 130–132°C/12 Torr (Lit.²²⁾ 135°C/16 Torr).

19) E. Möller, Ber. Deut. Chem. Ges. **43**, 3251 (1910).

20) A. Fredga, Ark. Kemi **24** A, 1 (1947).

21) W. N. Harworth und E. L. Jones, J. Chem. Soc. **1926**, 1858.

22) T. S. Patterson und D. C. Patterson, J. Chem. Soc. **107**, 142 (1915).