ETH zürich

ETH Library

Konstitution der Rifamycine

Doctoral Thesis

Author(s):
Oppolzer, Wolfgang

Publication date:
1963

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000095030

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Prom. Nr. 3462

Konstitution der Rifamycine

Von der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften
genehmigte

PROMOTIONSARBEIT

vorgelegt von

WOLFGANG OPPOLZER
Chemiker, Universität Wien
Österreichischer Staatsangehöriger

Referent: Herr Prof. Dr. V. Prelog
Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Arigoni

Juris-Verlag Zürich
1963

Leer - Vide - Empty

Meinen lieben Eltern
und
meiner lieben Frau

in Dankbarkeit gewidmet

Leer - Vide - Empty

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. V. Prelog,

unter dessen Leitung ich die vorliegende Arbeit durchführen durfte, möchte ich für alle wertvollen Ratschläge und Anregungen, sowie für die unermüdliche Hilfe, die er mir stets zuteil werden liess, herzlich danken.

Leer - Vide - Empty

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung 8

THEORETISCHER TEIL 9

A. Analytische Daten und die funktionellen Gruppen der Rifamycine 10

B. Methanolyse des Iminoäthers (V) aus Rifamycin-S 14

C. Konstitution der Verbindung (VI) $C_{14}H_{11}O_6N$ und des aromatischen Teils der Rifamycine 15

D. Konstitution der Verbindungen (VII) $C_{25}H_{42}O_8$, (VIII) $C_{24}H_{38}O_7$ und der aliphatischen Brücke in den Rifamycinen 21

E. Die ansa-Konstitution der Rifamycine 35

F. Verknüpfungsstellen der aliphatischen Brücke mit dem aromatischen Teil 37

EXPERIMENTELLER TEIL 39

A. Allgemeine Bemerkungen 39

B. Rifamycine und ihre Derivate 40

C. Reduktive Acetylierung von Triacetyl-rifamycin-SV 45

D. Kalischmelze von Tetrahydro-rifamycin-S 46

E. Abbau von Rifamycin-S mit Ozon 47

F. Hydrierung des Chinondiazids aus Rifamycin-O 50

G. Oxydation der Hydrierungsprodukte von Rifamycin-S mit Salpetersäure 52

H. Methanolyse des Iminoäthers aus Rifamycin-S 57

J. Systematischer Abbau des Dimethylacetals (VII) $C_{25}H_{42}O_8$ 62

Zusammenfassung 67

Literaturverzeichnis 68

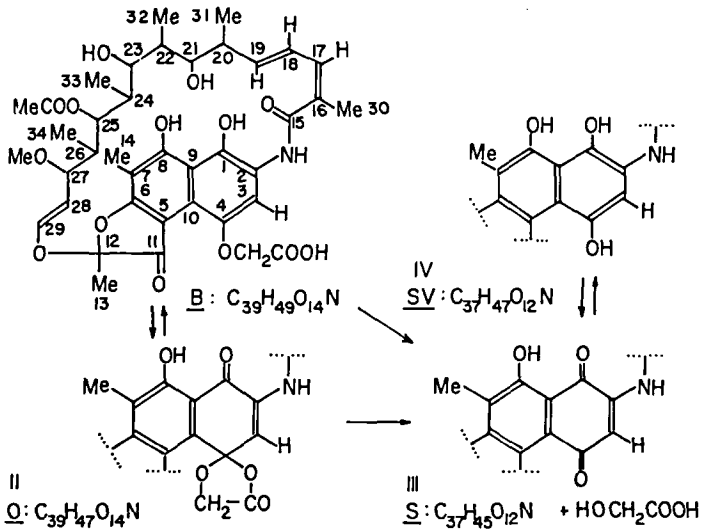
EINLEITUNG

Rifamycine sind Stoffwechselprodukte von Actinomyceten, die in den Forschungslaboratorien der Lepetit, Mailand, aus Kulturen von Streptomyces mediterranei n. sp. isoliert wurden[1]. Unter bestimmten Züchtungsbedingungen stellt das Rifamycin-B das genuine Hauptprodukt dieser Verbindungsgruppe dar. Es handelt sich um eine empfindliche Verbindung von geringer antibiotischer Wirksamkeit, deren wässrige, sauer reagierende Lösung in Gegenwart von Luft jedoch nach einiger Zeit starke antibiotische Aktivität aufweist, die, wie in Anbetracht dieses vielversprechenden Befundes angestellte Versuche zeigten, auf der Bildung von Rifamycin-S beruht. In gepufferter Lösung lässt sich das Rifamycin-B durch milde Oxydationsmittel unter Verlust von zwei Wasserstoffatomen zum antibiotisch kaum aktiven Rifamycin-O[2] oxydieren; dieses bildet, einer milden Säurebehandlung unterworfen, das antibiotisch hochaktive Rifamycin-S[3], wobei ein Mol Glykolsäure hydrolytisch abgespalten wird. Aus Rifamycin-O kann durch milde Reduktionsmittel z.B. Ascorbinsäure, das Rifamycin-B[2] regeneriert werden; die Reduktion von Rifamycin-S führt zum Rifamaycin-SV[3], das auf Grund seiner hohen antibiotischen und chemotherapeutischen Wirksamkeit Eingang in die medizinische Praxis gefunden hat. Die praktische Verwendbarkeit der Rifamycine war der Anlass zu näherem Studium der Verbindungen und ihrer Derivate, die in den Laboratorien der Lepetit von P. Sensi und Mitarbeitern in grosser Anzahl hergestellt und untersucht wurden[4].

Ueber die chemische Konstitution und insbesondere das Gerüst der Rifamycine war zu Beginn der vorliegenden Arbeit praktisch nichts bekannt und es erschien reizvoll, diese technisch leicht zugängliche Verbindungsklasse hinsichtlich ihrer chemischen Konstitution eingehend zu erforschen. Für die Ueberlassung grösserer Quantitäten von Rifamycinen danke ich bestens Herrn Prof. P. Sensi und der Lepetit in Mailand.

THEORETISCHER TEIL

Eigene eingehende Untersuchungen und Interpretationen von bekannten Eigenschaften der 4 erwähnten Rifamycine führten zu den im Formelschema 1 wiedergegebenen Konstitutionsformeln. Die in der vollständigen Formel von Rifamycin-B



Formelschema 1

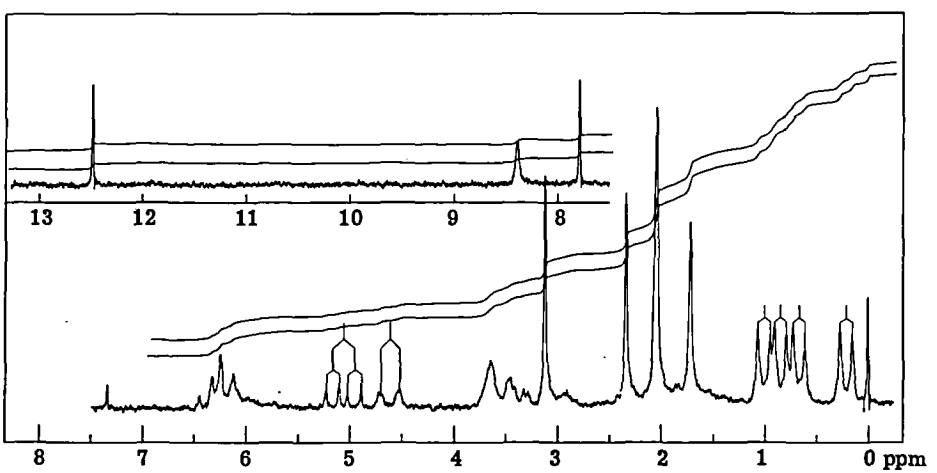
angegebene Numerierung wird weiterhin systematisch bei der Ableitung der Konstitution verwendet, um einzelne Kohlenstoffe und an ihnen sitzende Funktionen zu identifizieren. Die Formeln (I) bis (IV) demonstrieren das aus den Eigenschaften und analytischen Daten ersichtliche Verhältnis der vier Rifamycine.

A. Analytische Daten und die funktionellen Gruppen der Rifamycine

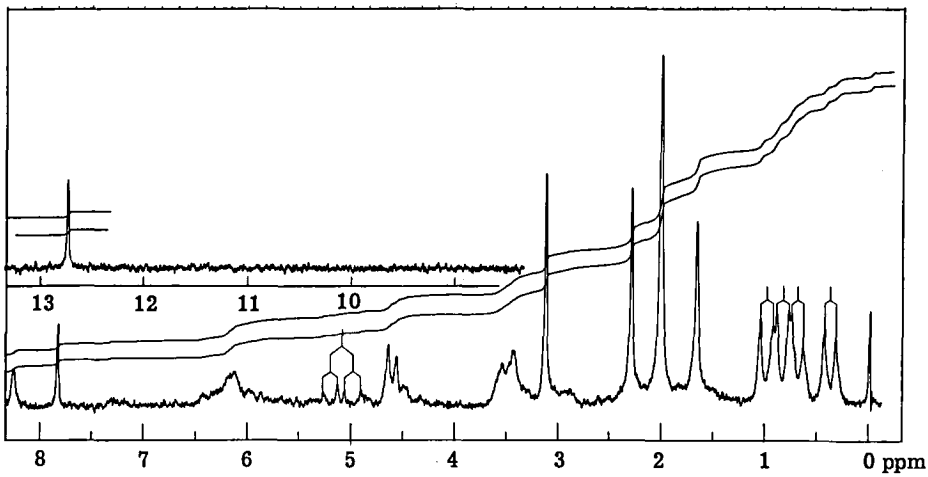
Auf Grund von Analysen und Abbauergebnissen besitzt das Rifamycin-B (I) die Bruttoformel $C_{39}H_{49}O_{14}N$. Es handelt sich um eine gelbe dibasische Säure (pK^*_{MCS}: 2,60/7,76) mit typischen Absorptionsspektren im UV., Sichtbaren und IR.[1], die auf einen ausgedehnten aromatischen Chromophor und eine Reihe von funktionellen Gruppen hinweisen. Die Oxydation von Rifamycin-B zu Rifamycin-O, (II) $C_{39}H_{47}O_{14}N$, ist mit Aenderungen in den Absorptionsspektren verbunden, von denen besonders das Auftreten einer neuen Bande im IR. bei 1820 cm^{-1} ins Auge fällt. Es ist weiter bemerkenswert, dass Rifamycin-O eine einbasische Säure (pK^*_{MCS}: 7,61) darstellt. Obwohl die reversible Oxydation-Reduktion auf ein Verhältnis Hydrochinon - Chinon hinweist, finden offenbar bei der Umwandlung von Rifamycin-B in Rifamycin-O weitere Reaktionen statt, auf welche die IR.-Absorptionsbande bei 1820 cm^{-1}, sowie der Verlust einer sauren Funktion im Laufe der der Oxydation zurückzuführen sind. Die im Bild 1 formulierte Entstehung eines Fünfring-Spirans am C 4 erklärt diesen Sachverhalt in befriedigender Weise und konnte durch von P. Sensi und Mitarbeitern[5] angestellte Modellversuche mit einfachen p-Hydroxyphenäthern der Glykolsäure gestützt werden. Die Chinon-ketalester-Gruppe im Rifamycin-O reagiert leicht mit wässrigen Säuren unter hydrolytischer Abspaltung von Glykolsäure und Bildung von Rifamycin-S, (II) einer tiefgelben monobasischen Säure (pK^*_{MCS}: 7,16) der Zusammensetzung $C_{37}H_{45}O_{12}N$. Die Reduktion von Rifamycin-S zur tiefgelben monobasischen Säure Rifamycin-SV (IV), $C_{37}H_{47}O_{12}N$ (pK^*_{MCS}: 2,96), ist allem Anschein nach nichts anderes, als die Reduktion eines Chinons zum entsprechenden Hydrochinon. Der Stabilität des Rifamycin-S gegenüber 15-stündiger Behandlung mit einer gesättigten Lösung von Blei(IV)-acetat in Eisessig nach zu urteilen, handelt es sich nicht um ein ortho-chinoides System.

Durch die besprochene Reaktionen ist die Funktion von 4 der 14 Sauerstoffatome im Rifamycin-B und -O bzw. von 2 der 12 Sauerstoffatome im Rifamycin-S und -SV bestimmt. Durch Gruppenanalysen und Herstellung von Derivaten kann die Funktion von weiteren 7 allen vier Rifamycinen gemeinsamen Sauerstoffatomen, sowie des Stickstoffs abgeklärt werden. Eine Methoxy- und eine Acetoxy-Gruppe lassen sich sowohl mikroanalytisch bestimmen, als auch in den NMR-Spektren eindeutig erkennen. Ein Sauerstoffatom liegt in Form eines stark sauren phenolischen Hydroxyls vor,

das offenbar in peri-Stellung zum Hydrochinon- bzw. Chinon-System steht. Darauf weisen nicht nur die Aenderungen der pK^*_{MCS}-Werte beim Uebergang Hydrochinon-Chinon und die Farbreaktion des Rifamycin-S mit Boressigsäureanhydrid[6], sondern auch die NMR-signale von Rifamycin-S und -O bei $\delta = 12,5$ resp. $\delta = 12,7$ ppm [7] hin. Durch Behandlung von Rifamycin-S mit Methyljodid - Silberoxid kann diese an C 8 sitzende Hydroxylgruppe selektiv methyliert werden, wobei sowohl die Acidität, wie auch das NMR-signal bei 12,5 verloren gehen. Das Vorliegen von zwei sek. Hydroxylen geht aus der Entstehung eines 0,0'-Diacetyl-Derivates bei energischer Acetylierung des erwähnten 8-O-Methyläthers hervor. Dieses Diacetyl-Derivat weist im 3μ-Gebiet des IR.-Absorptionsspektrums ausser einer scharfen N-H-Bande bei 3360 cm^{-1} keine weitere Bande auf; es sind also darin keine nicht-acetylierbaren Hydroxyle vorhanden. Das 8-O-Methyl-rifamycin-S lässt sich ebenso, wie Rifamycin-S zum entsprechenden Hydrochinon reduzieren, das bei darauffolgender Methylierung in 1-0, 4-0, 8-0-Trimethyl-rifamycin-SV (XXX) übergeführt werden kann, dessen IR.-Absorptionsspektrum (in CCl_4) anhand von Banden bei 3420(m), 1675(s) und 1541(s) cm^{-1} die Anwesenheit einer sek. Amid-Gruppe vermuten lässt. Diese Vermutung konnte angesichts eines bei der oben beschriebenen Methylierung von Rifamycin-S als Nebenprodukt anfallenden Mono-methyl-Derivates, das sich in der Folge als ein Imino-methyl-äther entpuppte, gerechtfertigt werden.



Figur 1 NMR-Spektrum von Rifamycin-S (III)



Figur 2 NMR-Spektrum von Rifamycin-O (II)

Das Rifamycin-SV gibt unter gewöhnlichen Aufnahmebedingungen keine scharfen NMR-Signale, bedingt durch Spuren von autooxydativ gebildeten semichinonartigen Produkten. Die NMR-Spektren der Rifamycine S und O sind dagegen gut aufgelöst (Figur 1 und 2). Sie bestätigen die analytischen Ergebnisse und liefern darüber hinaus wichtige weitere Auskünfte über die Konstitution der Rifamycine.

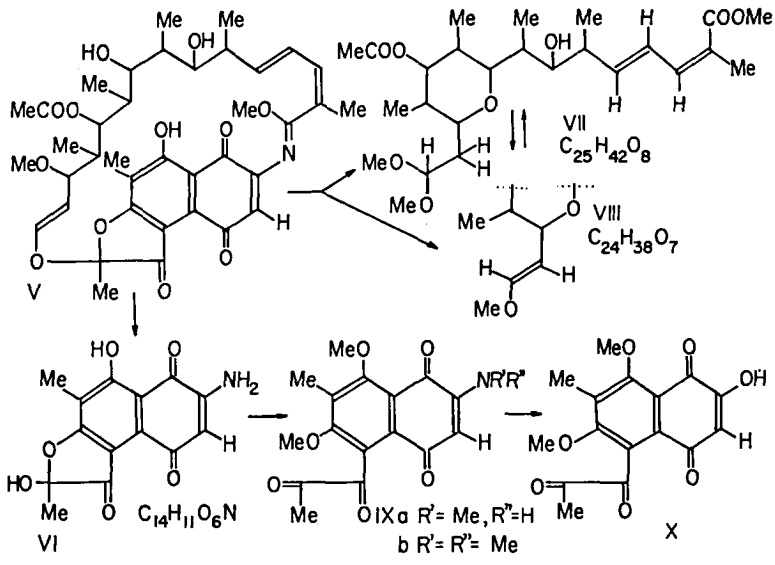
Im NMR-Spektrum des Rifamycin-S (Figur 1) sind bei teilweise ungewöhnlich hohen Magnetfeldstärken die Dublette ($J \sim 7$) von 4 CH_3-CH-Gruppen gut sichtbar. In Richtung niederer Feldstärken folgt bei 1,72(s, 3H) das Signal einer Methyl-Gruppe an Ketal-Kohlenstoff, sowie bei 2,03(s, 6H) die beiden aufeinanderfallenden Singletts der Acetyl- und einer Methyl-Gruppe an C-C-Doppelbindung und weiters bei 2,32(s, 3H) das Signal einer Methyl-Gruppe an aromatischen Kohlenstoff. Das Singlett bei 3,12(s, 3H) lässt sich einer O-Methyl-Gruppe an gesättigtem Kohlenstoff, das breite Dublett bei 4,60(d, J=10,5, 1H) einem Proton an acetoxysubstituiertem Kohlenstoff zuordnen. Von den Signalen der insgesamt 5 olefinischen Protonen liegt eines als "Quadruplett" bei 5,09(m, J_1 =7,5, J_2 =12,5, 1H) vor, die restlichen 4 erscheinen in Form eines sich von 5,7 bis 6,5 erstreckenden Signalhaufens. Ein scharfes Singlett bei 7,80 (s, 1H) (s. Seite 14) entspricht dem Proton am Chinonring, ein breiteres Singlett bei 8,42 (s, 1H) dem Proton der N-H-Gruppe und das scharfe Signal bei 12,50(s, 1H) dem chelatisiertem Hydroxylproton an C-8 [7]. Das NMR-Spektrum des Rifamycin-O (Figur 2) zeigt, ausser einem zusätzlichen Signalhaufen

bei 4,5, der durch die 2 Methylenprotonen des Gykolsäurerestes hervorgerufen wird, keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem Spektrum des Rifamycin-S, ein Befund, der beim Uebergang von Rifamycin-O in Rifamycin-S gegen weitere neben der hydrolytischen Abspaltung des Glykolsäurerestes stattfindende Reaktionen spricht. Die fast gleiche chemische Verschiebung des dem C-8-Hydroxylprotons entsprechenden Signals in beiden Spektren, sowie die ähnlichen pK^*_{MCS}-Werte von Rifamycin-S und Rifamycin-O deuten darauf hin, dass auch im letzteren C-1 in Form einer Carbonyl-Gruppe vorliegt und in Hinblick auf die p-Chinon-Struktur des Rifamycin-S, der Glykolsäurerest am C-4 placiert sein muss.

Zur Beantwortung der Frage nach dem Gerüst der Rifamycine schien vor allem ein, ohne Kohlenstoffverlust durchführbarer Abbau zur grösseren Bruchstücken am besten geeignet. Versuche in dieser Richtung, Rifamycin-S und seine Hydrierungsderivate (s. Seite 21) hydrolytisch oder methanolytisch in einheitliche grössere Fragmente zu spalten blieben zuerst erfolglos. Als Produkte einer drastischen Kalischmelze von Tetrahydro-rifamycin-S konnten z.B. lediglich Essigsäure, Propionsäure, meso-α,α'-Dimethylpimelinsäure und Ammoniak nachgewiesen werden. Den ersten Hinweis auf die Möglichkeit, das aromatische System vom Rest der Molekel abzutrennen, lieferte ein durch Behandlung von Rifamycin-SV mit Acetanhydrid-Pyridin erhaltenes Triacetyl-rifamycin-SV. Wurde eine Lösung des letzteren in Acetanhydrid nach Zusatz von wasserfreiem Natriumacetat und Zinkstaub 1 Stunde gekocht, so konnte aus dem Reaktionsgemisch eine tiefblau fluoreszierende farblose Verbindung der Zusammensetzung $C_{26}H_{25}O_{12}N$ isoliert werden, die ausser 8 Methylgruppen an ungesättigtem Kohlenstoff und einem aromatischen Proton keine weiteren Wasserstoffatome enthält und die Eigenschaften eines Polyacetoxy-naphtalin-Derivates aufweist.

B. Methanolyse des Iminoäthers (V) aus Rifamycin-S

Auf der weiteren Suche nach für einen Abbau besser geeigneten Derivaten wurde ein bei der Methylierung von Rifamycin-S mit Methyljodid-Silberoxid als Nebenprodukt erhaltenes saures Monomethyl-Derivat $C_{38}H_{47}O_{12}N$ (pK^*_{MCS} 9,38), näher ins Auge gefasst und anhand seines spektralen Verhaltens als Iminomethyläther (V) identifiziert. Die Iminoäthergruppierung lässt sich im IR.-Absorptionsspektrum durch das Fehlen einer N-H-Bande, sowie die Anwesenheit einer sehr starken Bande bei 1632 cm^{-1} erkennen. Das NMR-Spektrum der Verbindung (V) weist neben anderen Signalen das Singlett des chelatisierten Hydroxylprotons bei 13,3 (s, 1H) auf, sowie das Signal der neu eingeführten Methyl-Gruppe bei 3,96(s, 3H), entsprechend einer Methoxy-Gruppe an ungesättigtem Kohlenstoff, während erwartungsgemäss das breite Singlett der N-H-Gruppe fehlt. Auffallend ist die chemische Verschiebung des in der Folge dem Proton am C-3 zugeordneten Signals bei 5,93 gegenüber 7,80 im Rifamycin-S. Angesichts der Tatsache, dass Protonen am C-2 oder C-3 von 1,4-Naphtochinonen gewöhnlich Anlass zu Signalen bei δ = 6 geben[7] legt dieser Befund die Vermutung nahe, dass die Amid-carbonyl-Gruppe im Rifamycin-S benachbart zum Proton am C-3 festgehalten wird[8]. Die UV.-Absorptionsspektren des Iminomethyläthers und des Rifamycin-S sind praktisch identisch.



Formelschema 2

Die milde Methanolyse des Iminomethyläthers aus Rifamycin-S lieferte als Hauptprodukte eine aromatische Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ (VI) und eine Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ (VII). Die erstere enthält kein Methoxyl, die zweite weist 3 Methoxyle auf. Die Reaktion lässt sich bilanzmässig durch die Gleichung $C_{38}H_{47}O_{12}N + CH_3OH + H_2O = C_{14}H_{11}O_6N + C_{25}H_{42}O_8$ darstellen. Als Nebenprodukte der Reaktion wurden isoliert: eine zu (VII) isomere (vermutlich stereoisomere) Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ und bei 1-stündiger Reaktionsdauer eine Verbindung mit 2 Methoxylen der Zusammensetzung $C_{24}H_{38}O_7$ (VIII).

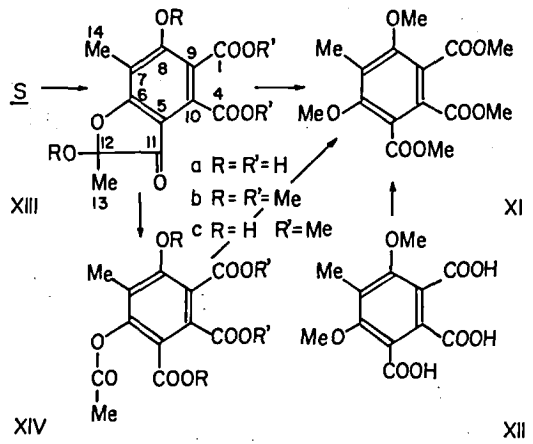
Die methanolytische Spaltung des Iminomethyläthers aus Rifamycin-S spielte eine Schlüsselrolle in der Konstitutionsaufklärung, indem sie zeigte, dass die Rifamycine aus zwei verschiedenen grossen Bausteinen aufgebaut sind und erlaubte diese Bausteine gesondert zu untersuchen.

C. Konstitution der Verbindung (VI) $C_{14}H_{11}O_6N$ und des aromatischen Teils der Rifamycine

Wie aus den Absorptionsspektren ersichtlich, enthält die Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ denjenigen Teil der Rifamycin-Molekel, der hauptsächlich für die Absorption im Sichtbaren und im UV. verantwortlich ist. Die Konstitution dieser Verbindung folgt insbesonders aus den Ergebnissen des Abbaus von Rifamycin-S mit Ozon. Aus dem durch Ozonisierung von Rifamycin-S und nachfolgende Oxydation mit Perameisensäure erhaltenem Reaktionsgemisch liessen sich auf Grund ihrer geringen Löslichkeit in Aceton zwei Säuren isolieren: eine aromatische Tricarbonsäure $C_{10}H_8O_8$ und eine aromatische Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$.

Die Tricarbonsäure konnte folgendermassen als 4,6-Dihydroxy-5-methylbenzol-1,2,3-tricarbonsäure identifiziert werden. Die Säure lässt sich durch Sublimation im HV in ein Anhydrid $C_{10}H_6O_7$ überführen, leicht erkennbar durch die Banden bei 1856(s) und 1777(s) cm^{-1} im IR.-Absorptionsspektrum. Behandlung der Tricarbonsäure mit Diazomethan in Methanol führte zu einem Dimethyläther-trimethylester (XI) $C_{15}H_{18}O_8$ dessen NMR-spektrum neben dem Signal einer Methyl-Gruppe am aromatischen Kohlenstoff bei 2,22(s, 3H) noch zwei weitere Signale bei 3,79(s, 9H) und 3,81 (s, 6H) entsprechend drei bzw. zwei untereinander identischen Methoxy-Gruppen an ungesättigtem Kohlenstoff aufweist. Die Identität des Dimethyläther-trimethylesters mit einem durch Veresterung von 4,6-Dimethoxy-5-methylbenzol-1,2,3-tricarbonsäure erhaltenem Präparat bestätigte dessen auf Grund obiger

Informationen abgeleitete Struktur (XI). Herrn Prof. J. H. Birkinshaw danke ich bestens für die Zusendung einer Probe von 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure, die im Laufe seiner Untersuchungen der Stoffwechselprodukte von Penicillium Cyclopium Westling hergestellt und deren Konstitution anhand des Abbaus zu 3,5-Dihydroxy-4-methyl-benzoesäure durch Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure bewiesen worden war [9].



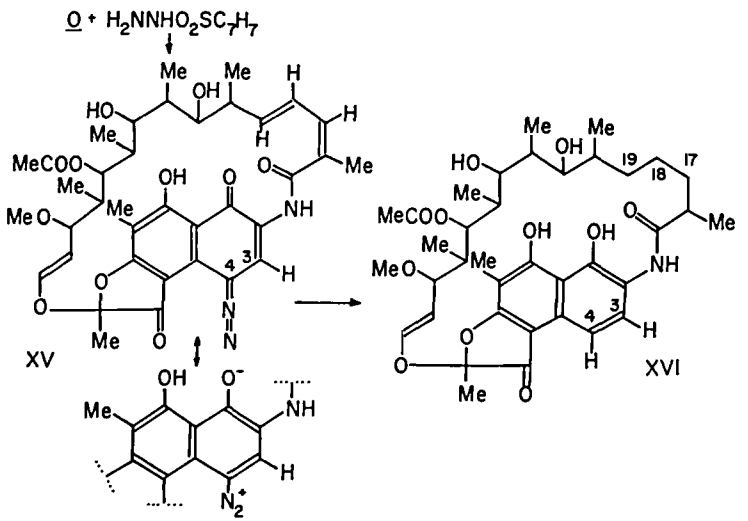
Formelschema 3

Die Konstitution (XIIIa) der Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ wurde auf folgendem Wege ermittelt. Die Dicarbonsäure lieferte durch Behandlung mit Acetanhydrid-Pyridin eine Diacetyl-anhydrid $C_{16}H_{12}O_9$, dessen IR.-Absorptionsspektrum intensive Banden bei 1856, 1777 und 1745 cm^{-1} aufweist. Umsetzung der Säure mit einem Ueberschuss Methyljodid-Silberoxid führte zu einem Dimethyläther-dimethylester (XIII b) $C_{16}H_{18}O_8$ dessen NMR-Spektrum auf eine Methyl-Gruppe an Ketal-Kohlenstoff: 1,52(s, 3H), eine Methyl-Gruppe an aromatischem Kohlenstoff: 2,25(s, 3H), eine Methoxy-Gruppe an gesättigtem Kohlenstoff: 3,21(s, 3H) und auf eine verschiedene, sowie auf zwei voneinander nicht unterscheidbare Methoxy-Gruppen an ungesättigtem Kohlenstoff: 3,80(s, 3H); 3,90 (s, 6H) hindeutet. Die unter Beachtung dieser analytischen und spektralen Daten angenommene Struktur (XIIIa) der Dicarbonsäure war durch einen gezielten Abbau leicht zu beweisen. Der aus der Säure mit einem Unterschuss Methyljodid - Silberoxyd hergestellte Dimethylester

(XIIIc) $C_{14}H_{14}O_8$ liess sich mit Natriumperjodat in überaus glatter Reaktion zu einer Acetoxycarbonsäure (XIV c) spalten, die nach Einwirkung von Diazomethan in Methanol den 6-Acetoxy-4-methoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (XIV b) ergab. Die Acetoxy-Gruppe in dieser Verbindung, im IR.-Absorptionsspektrum anhand einer Bande bei 1780(s) cm^{-1} und im NMR-Spektrum anhand eines Signals bei 2,11(s, 3H) leicht nachweisbar, wurde methanolytisch entfernt; Verätherung des freien phenolischen Hydroxyls mit Diazomethan in Methanol führte zum 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (XI).

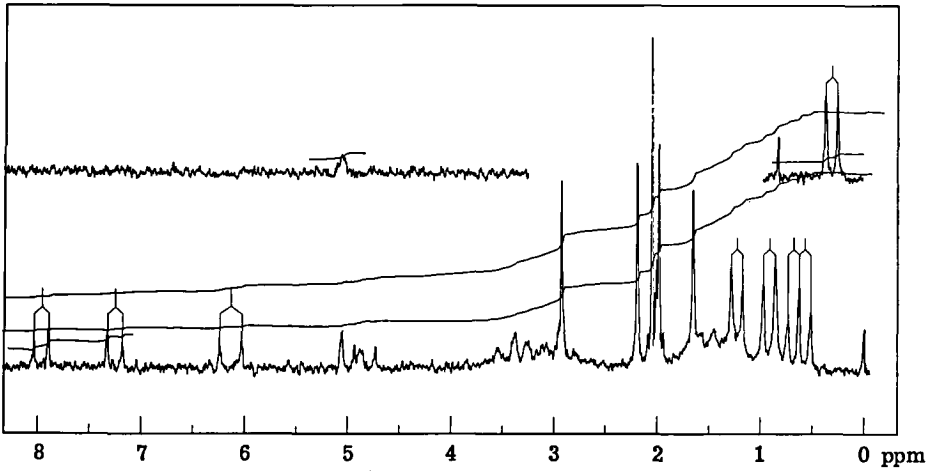
Die erwähnten Reaktionen bestimmen eindeutig das Gerüst eines 12 Kohlenstoffe umfassenden Teiles der Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$, der sich in Anbetracht der Eigenschaften der Rifamycine durch Angliederung der 2 restlichen Kohlenstoffe zu einem polysubstituiertem 1,4-Naphtochinon vervollständigen lässt. Es bleibt dann nur noch die Frage offen, ob die bisher nicht lokalisierte Amino-Gruppe an C-2 oder am C-3 sitzt.

Für die Lage der Amino-Gruppe am C-2 kann man folgende Argumente anführen. Das Rifamycin-O reagiert mit p-Toluol-sulfonylhydrazin unter Abspaltung von



Formelschema 4

Glykolsäure und p-Toluolsulfinat-Ion sowie Bildung eines sog. Chinondiazids (XV)*), eine Reaktion, die bei einfachen Chinonen oft beobachtet wurde[11]. Die Konstitution dieser Verbindung folgt aus ihrer Entstehungsweise**), aus analytischen und spektralen Daten, insbesonders aus der Anwesenheit der für Chinondiazide typischen IR.-Absorptionsbande bei 2120 cm^{-1}. Chinondiazide sind Resonanzhybride mit einer dem Anion des entsprechenden Hydroxy-phenyl-diazonium-Ions ähnlichen Elektronenverteilung[12]. Das Chinondiazid (XV) aus Rifamycin-O liess sich durch katalytische Hydrierung in eine Verbindung (XVI) überführen, in der die Diazoniumgruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt***) und das konjugierte Doppelbindungssystem abgesättigt ist, also ein Desoxy-tetrahydro-rifamycin-SV. Die Verbindung (XVI) ist eine starke einbasische Säure (pK^*_{MCS}: 4,44), sie besitzt demnach zwei Hydroxyle in peri-Stellung. Im NMR-Spektrum (Figur 3) weist sie bei 7,25(d, J = 8,5, 1H) und bei 7,95(d, J = 8,5, 1H) Signale auf, die zwei aromatischen zueinander ortho-ständigen Protonen entsprechen. Da ein Wasserstoff von der Chinon-azetal-gruppe ausgehend



Figur 3 NMR-Spektrum von Desoxytetrahydro-rifamycin-SV (XVI)

*) Die Herstellung eines Chinondiazids anhand einer undurchsichtigen und aufwendigen Reaktionsfolge, nämlich durch Behandlung eines Girard-T-Adduktes von Rifamycin-O mit einem Ueberschuss Rifamycin-O war bereits von P. Sensi und Mitarbeitern beschrieben[10].

**) Der Angriff des nucleophilen Hydrazids am C-4 des Rifamycin-O mit nachfolgender Abspaltung von Glykolsäure lässt sich zwangslos erklären.

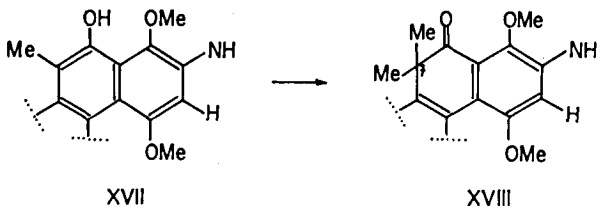
***) Austausch der Diazogruppe gegen Wasserstoff ist bei Chinondiaziden noch nicht, wohl aber bei Diazoketonen beschrieben[19].

über die Diazo-Gruppe an C-4 eingeführt wurde, muss der ursprünglich anwesende zweite aromatische Wasserstoff am C-3 und demzufolge der Stickstoff am C-2 sitzen. Eine eventuelle Position des Stickstoffs an C-11 oder C-12 in Erwägung ziehend, wurde zur weiteren Untersuchung die Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ 15 Std. mit Methyljodid - Kaliumcarbonat in Aceton bei 100° behandelt. Dabei konnte ein 0,0'-Dimethyl-N-methyl-Derivat $C_{17}H_{17}O_6N$ (IXa), sowie ein 0,0'-Dimethyl-NN-dimethyl-Derivat $C_{18}H_{19}O_6N$ (IXb) erhalten werden. In beiden Derivaten ist der ketalische Fünfring geöffnet, wie aus ihren NMR-Spektren hervorgeht, von denen hier der Einfachheit halber nur das Spektrum des letzteren Derivates diskutiert wird. Die chemische Verschiebung des Signals der Methyl-Gruppe C-13: 2,57(s, 3H) weist auf eine Methylketon-Struktur hin und die Signale von 2 Methoxy-Gruppen: 3,72(s, 3H); 3,88(s, 3H), zeigen deren Stellung an ungesättigtem Kohlenstoff. Das Singlett bei 3,18(s, 6H) entspricht der Dimethylamino-Gruppe und das Signal bei 2,27(s, 3H) der Methyl-Gruppe am Benzolring. Das IR.-Absorptionsspektrum des 0,0'-Dimethyl-N-dimethyl-Derivates zeigt im 3μ-Gebiet keine Bande, dagegen das 0,0'-Dimethyl-N-methyl-Derivat bei 3390 cm^{-1} die scharfe Bande der N-H-Gruppe. Die analytischen und spektroskopischen Befunde der beiden Methylderivate schliessen eine Position des Stickstoffs an C-11 oder C-12 aus und bestätigen die Konstitution (VI), für die Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$. Ferner sollte sich ein 2-Amino-1,4-chinon hydrolytisch unter Verlust der Amino-Gruppe in ein 2-Hydroxy-1,4-chinon überführen lassen[14], das sich durch seine Acidität, sowie Komplexbildungstendenz mit Titansalzen auszeichnet[15]. 4-stündige Behandlung des 0,0'-Dimethyl-N-methyl-Derivates mit 10-proz. wässriger Salzsäure bei 60° führte zu einer stickstoffreien Verbindung $C_{16}H_{14}O_7$ (X), die alle erwarteten Eigenschaften aufweist.

Nach Abschluss des Konstitutionsbeweises für das aromatische System seien nun einige Eigenschaften und Reaktionen der Rifamycine angeführt. Rifamycin-SV gab nach 15-stündiger Behandlung mit Methyljodid-Kaliumcarbonat in Aceton neben anderen Produkten 1-0,4-0-Dimethyl-rifamycin-SV (XVII), das unter den gleichen Bedingungen methyliert, eine kristalline hellgelbe Verbindung (XVIII) der Zusammensetzung $C_{40}H_{53}O_{12}N$ lieferte, die auf Grund ihres spektralen Verhaltens als 1-0,4-0-Dimethyl-7-C-methyl-"rifamycin-SV" identifiziert werden konnte. Die je nach Gegenwart, oder Abwesenheit von Silberionen unterschiedliche Reaktivität von zwei Zentren (Sauerstoff am C-8 respektive Kohlenstoff -7) des gleichen mesomeren Anions gegenüber Methyljodid entspricht den Gesetzmässigkeiten der ambidenten Reaktionen[16].

Der infolge C-Methylierung gebildeten gem-Dimethylgruppierung am C-7 ist im NMR-Spektrum ein Singlett bei 1,55(s, 6H) zuzuordnen, während das in allen Rifamycinen sichtbare Signal einer Methyl-Gruppe an aromatischem Kohlenstoff fehlt. Das UV.-Absorptionsspektrum der Verbindung (XVIII) zeigt in Relation zum 1-0,4-0,8-0-Trimethyl-rifamycin-SV deutliche Unterschiede, das IR.-Absorptionsspektrum eine zusätzliche intensive Bande im 6μ-Gebiet.

Wie schon erwähnt, ist die Hydroxyl-Gruppe am C-8 für die sauren Eigenschaften der Rifamycine verantwortlich. Die Aciditäten des Rifamycins-O (II) (pK^*_{MCS} 7,61), des Rifamycins-S (III) (pK^*_{MCS} 7,16), des Iminomethyläthers (V) (pK^*_{MCS} 9,38)*), der Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ (VI) (pK^*_{MCS} 7,12), des Chinondiazids (XV) (pK^*_{MCS} 10,41), des Rifamycins-SV (IV) (pK^*_{MCS} 2,96), sowie des 4-Desoxy-tetrahydro-rifamycins-SV (XVI) (pK^*_{MCS} 4,44) lassen sich hauptsächlich auf die Stabilisierung der entsprechenden konjugierten Basen durch Mesomerie zurückführen. Die besonders starke Acidität der zwei letztgenannten Verbindungen beruht offenbar auf der zusätzlichen Stabilisierung des Monoanions durch sterisch begünstigte Wasserstoffbrückenbildung.

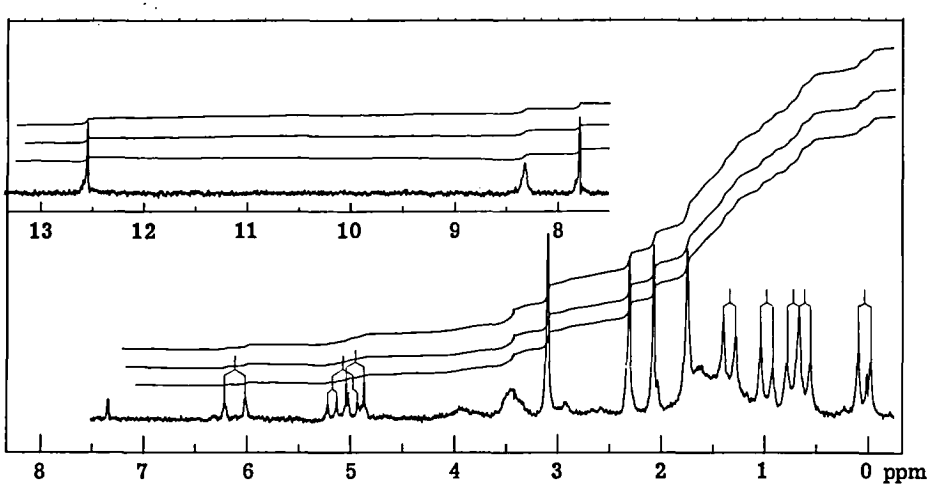


Formelschema 5

*) Die geringere Acidität des Iminomethyläthers (V) im Verhältnis zum Rifamycin-S ist allem Anschein nach durch das Fehlen des Wasserstoffs am Stickstoff der Amid-Gruppe in dieser Verbindung bedingt, der auf Grund von Wasserstoffbrückenbildung die Acidität der Rifamycine erhöht.

D. Konstitution der Verbindungen (VII) $C_{25}H_{42}O_8$, (VIII) $C_{24}H_{38}O_7$ und der aliphatischen Brücke in den Rifamycinen

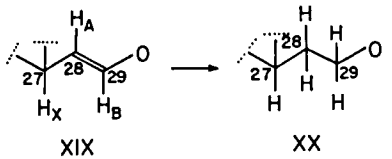
Die ersten Hinweise auf die Konstitution der aliphatischen Brücke in den Rifamycinen liessen sich durch Hydrierung von Rifamycin-S und Oxydation der Hydrierungsprodukte mit Salpetersäure erhalten. Das Rifamycin-S absorbiert rasch drei Mol Wasserstoff unter Entstehung von Tetrahydro-rifamycin-SV, das leicht zum Tetrahydro-rifamycin-S (XIX) oxydiert werden kann. Das Differential-UV-Absorptionsspektrum Rifamycin-S - Tetrahydro-rifamycin-S (λ_{max} in mμ (log ε): 220 (4,09); 256 (4,04)) deutet auf die im Verlauf der Hydrierung stattfindenden Absättigung zweier Doppelbindungen eines konjugierten Systems von drei Doppelbindungen hin. Aus dem Vergleich des NMR-Spektrums von Tetrahydro-rifamycin-S (Figur 4) mit dem Spektrum von Rifamycin-S (Figur 2) ist im Tetrahydro-rifamycin-S



Figur 4 NMR-Spektrum des Tetrahydro-rifamycins (XIX)

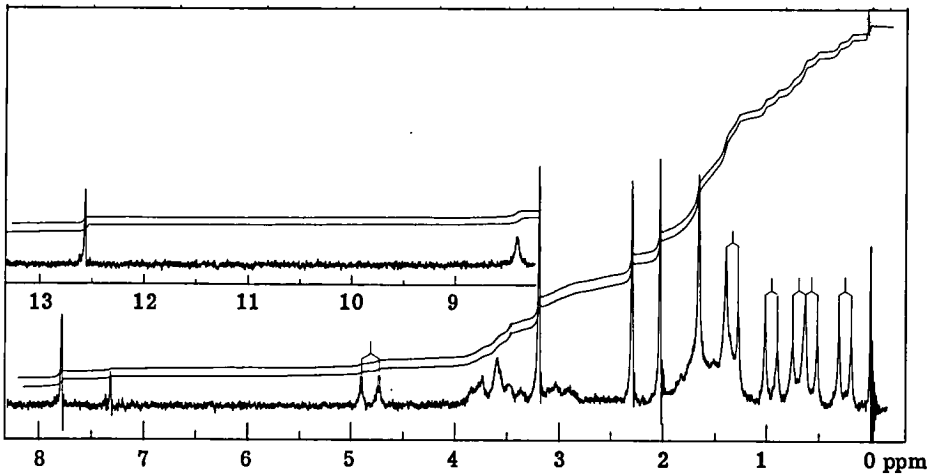
der Verlust von drei olefinischen Protonen, sowie die Ueberführung einer Methyl-Gruppe an C-C-Doppelbindung in eine CH_3-CH-Gruppe ersichtlich. Die restlichen zwei olefinischen Protonen, deren Signale den AB-Teil eines ABX-Systems ($J_{BX} = 0$, $J_{AX} = 5,2$, $J_{AB} = 12$) repräsentieren, lassen sich in Uebereinstimmung mit Modellsubstanzen[20] an den α- und β -Kohlenstoffen des in Formelschema 6

wiedergegebenen Enoläthersystems lokalisieren. Das Signal von B bei 6,12 (d, J = 12, 1H) entspricht dem Proton am C-29 und wird durch das benachbarte transständige Proton A am C-28 zu einem Dublett aufgespalten. Das bei 5,07 (m, J_1 = 12, J_2 = 5,2, 1H) erscheinende Signal des Protons A wird sowohl durch das Proton B, wie auch durch ein Methinproton X am C-27 aufgespalten.



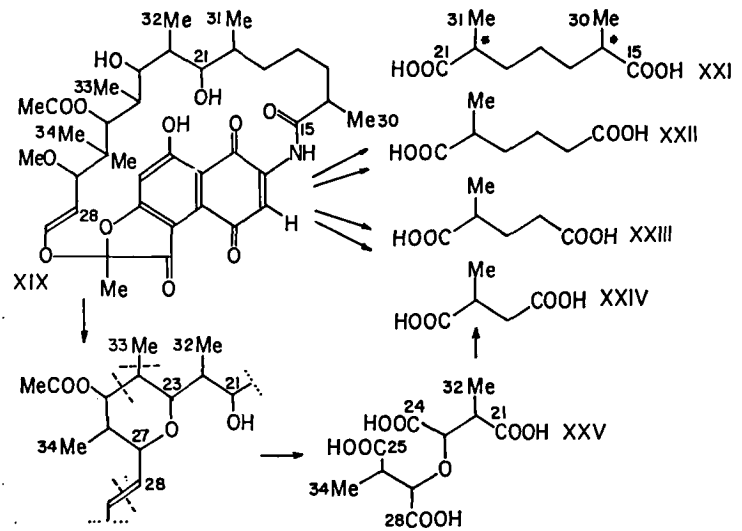
Formelschema 6

Die enolische Doppelbindung kann durch energische Hydrierung ebenfalls abgesättigt werden; milde Oxydation des Hydrierungsproduktes führte zum Hexahydro-rifamycin-S (XX), dessen UV-Absorptionsspektrum relativ zum Tetrahydro-rifamycin-S keine Aenderung erfahren hat, während im NMR-Spektrum (Figur 5) nun auch



Figur 5 NMR-Spektrum des Hexahydro-rifamycin-S (XX)

die im Spektrum des Tetrahydro-rifamycins-S sichtbaren Signale von zwei olefinischen Protonen verschwunden sind. Im Einklang mit der Absättigung einer Enoläther-Doppelbindung zeigt dafür die NMR-Integrationskurve in dem Bereich, der den Signalen von Wasserstoffatomen am α -Kohlenstoff gesättigter Aether zukommt, einen Zuwachs entsprechend zwei Protonen.



Formelschema 7

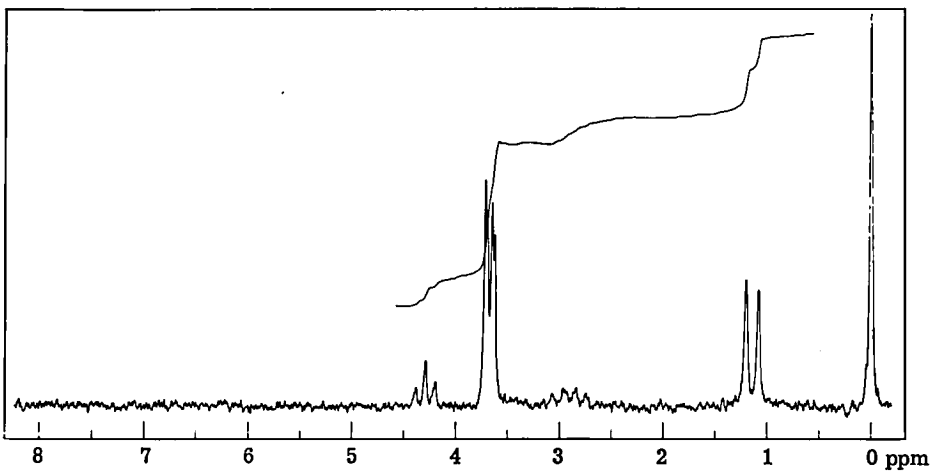
Der oxydative Abbau von Tetrahydro-rifamycin-S mit wässriger Salpetersäure ergab eine Reihe von Säuren, von denen Oxalsäure, Methylbernsteinsäure, α -Methylglutarsäure, α -Methyladipinsäure, meso- und + α, α'-Dimethylpimelinsäure, sowie eine Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ identifiziert werden konnten. Die Isolierung der beiden in dominierender Ausbeute gebildeten α , α'-Dimethyl-pimelinsäuren*)

*) Die zwei diastereomeren α , α'-Dimethylpimelinsäuren wurden in Form ihrer Dianilide voneinander getrennt, wobei sich das optisch inaktive Dianilid mit einem synthetischen meso- α, α'-Dimethylpimelinsäuredianilid-präparat [17] in jeder Hinsicht identisch erwies.

spricht dafür, dass das Tetrahydro-rifamycin-S ein Gemisch zweier Diastereomeren darstellt, das bei der Hydrierung des konjugierten Doppelbindungssystems entstehen kann, und bestimmt eindeutig die Konstitution der Kohlenstoffkette in den Rifamycinen zwischen C-15 und C-21. Die niedrigeren Dicarbonsäuren stammen offenbar aus dem gleichen Teil der Kette.

Die Konstitution der optisch aktiven Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ (XXV) wurde aus folgenden Daten abgeleitet:

1) Die Mikrotitration der Säure lässt zwei Stufen erkennen, pK^*_{MCS} 5,51/9,44; der Vergleich mit den Modellverbindungen: α, α'-Dimethylbernsteinsäure (pK^*_{MCS} 5,72/9,47) und Aethylmalonsäure (pK^*_{MCS} 4,79/9,38) stützt die angegebene Formel (XXV).



Figur 6 NMR-Spektrum des Tetramethylesters der Tetracarbonsäure (XXV)

2) Anhand des NMR-Spektrums des Tetramethylesters (Figur 6): Die zwei voneinander nicht unterscheidbaren C-Methyl-Gruppen verursachen ein Dublett bei 1,14(d, J=7, 6H), die beiden zum Aether-Sauerstoff β-ständigen Methinprotonen ergeben einen sich von 2,5 bis 3,2 streckenden Signalhaufen (2H), die vier Methoxy-Gruppen zeigen vier Singletts zwischen 3,6 und 3,7 und den zwei α-ständigen Methinprotonen entspricht eine Ueberlagerung von zwei Dubletten mit dem Schwerpunkt bei $\delta \sim 4,3$ (2H).

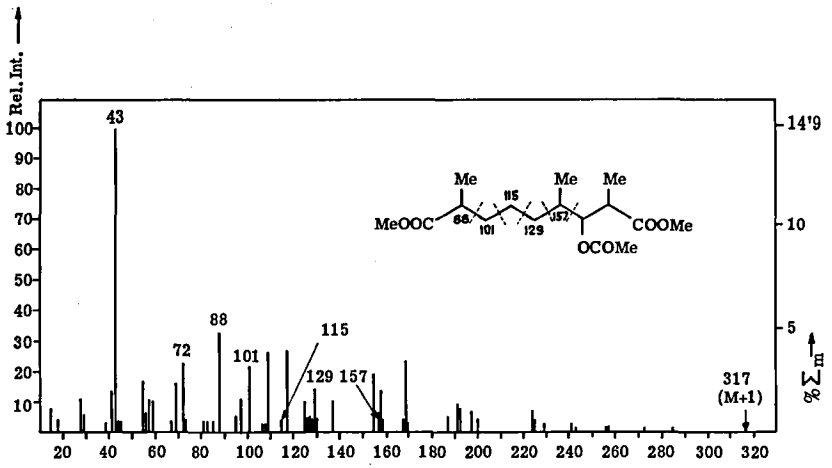
3) Auf Grund des Abbaus zu Methylbernsteinsäure, der durch Erhitzen mit Bromwasserstoffsäure und katalytischer Hydrierung des Reaktionsgemisches durchgeführt wurde*).

Die Tetracarbonsäure (XXV) ist für die Ableitung der Konstitution des sich von C-21 bis C-28 erstreckenden Teils der Brücke von Bedeutung, denn sie enthält alle Kohlenstoffe dieses Teils bis auf das Methyl C-33 (s. Formelschema 7). Man muss allerdings annehmen, dass unter der Einwirkung von Säuren aliphatische Kette vor der Oxydation zu einem Tetrahydropyran-Derivat cyclisiert wurde, wie weitere Untersuchungen zeigten (s. Seite 38), eine sehr plausible Annahme.

Das rohe Hexahydro-rifamycin-SV lieferte durch Behandlung mit heisser Salpetersäure in Eisessig ein Säuregemisch woraus nach Veresterung mit Diazomethan eine Verbindung der Zusammensetzung $C_{16}H_{28}O_6$ isoliert und auf Grund von NMR- und Massen-spektroskopischen Befunden, sowie des Abbaus zu α, α'-Dimethylpimelinsäure als β-Acetoxy-α, γ, η-trimethylazelainsäure-dimethylester identifiziert werden konnte.

Das NMR-Spektrum der Verbindung $C_{16}H_{28}O_6$ zeigt deutlich die Dublette von drei CH_3-CH-Gruppen im Bereich von $\delta \sim 1$ und das Signal einer Acetoxy-Gruppe bei 1,79(s, 3H). Ein charakteristisches "Quadruplett" bei 4,95 ($J_{AX} = 5$, $J_{BX} = 7$, 1H) entsprechend dem X-Teil eines ABX-Systems, wird durch ein Proton an acetoxysubstituiertem Kohlenstoff verursacht. Ein Singlett bei 3,60 (s, 6H) ist auf die zwei Carbomethoxygruppen zurückzuführen. Die Signale von nur zwei Protonen an dazu benachbarten Kohlenstoffen in Form eines Signalhaufens mit dem Schwerpunkt bei 2,5 (2H) weisen auf je eine Methylgruppe neben den beiden Carbomethoxygruppen hin. Das Massenspektrum (s. Figur 7) bestätigte die α- und η-Position je einer Methylgruppe[18] anhand eines intensiven "Umlagerungs"-Signals bei $88 \frac{m}{e}$, sowie durch die Abwesenheit eines entsprechenden Signals bei $74 \frac{m}{e}$. Die dritte Methyl-Gruppe lässt sich bei Betrachtung der homologen Bruchstücke mit der Massenzahl 101, 115, 129, - , $157 \frac{m}{e}$ durch das Ausbleiben eines Signals bei $143 \frac{m}{e}$ lokalisieren. Ein schwaches " M+1 "-Signal bei $317 \frac{m}{e}$ ist mit den analytischen Daten in Einklang. Der Abbau von besagter Verbindung wurde mit der pyrolytischen Entfer-

*) Die Identifizierung der durch Abbau gewonnenen Methylbernsteinsäure erfolgte durch Vergleich des daraus hergestellten Dianilids mit einem synthetischen Präparat.



Figur 7 Massenspektrum des β -Acetoxy- α, γ, β-trimethylazelainsäure-dimethylesters

nung der Acetoxygruppe eingeleitet, wobei ein α,β-ungesättigter Ester entsteht. Die aus letzterem durch Ozonisierung, Nachoxydation mit Perameisensäure und Verseifung hergestellte Dicarbonsäure erwies sich papierchromatographisch einheitlich und identisch mit α, α'-Dimethylpimelinsäure. Die Isolierung des β-Acetoxy-α, γ, η-trimethyl-azelainsäure-dimethylesters gibt wichtige Auskünfte über die Konstitution der Kohlenstoffkette von C-15 bis C-23.

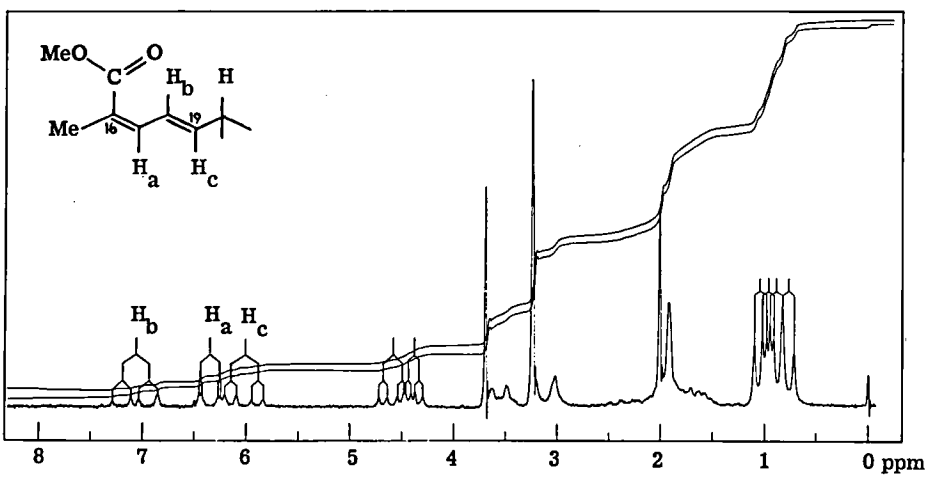
Die auf diese Weise erhaltenen Informationen gestatteten eine planvolle Untersuchung der Verbindungen $C_{25}H_{42}O_8$ und $C_{24}H_{38}O_7$, die bei der Methanolyse des Iminomethyläthers (V) entstehen (s. Formelschema 2). Wurde der Iminomethyläther mit 1-proz. methanolischer Salzsäure nur 15 Min. behandelt so bestand der neutrale Anteil des Reaktionsgemisches aus zwei isomeren, vermutlich stereoisomeren (s. Seite 38), Verbindungen der Zusammensetzung $C_{25}H_{42}O_8$ im Verhältnis 3:1. Von den beiden Isomeren wird in der vorliegenden Arbeit nur das vorherrschend gebildete näher beschrieben.

Die Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ (VII) ist, wie aus dem weiter unten diskutierten NMR-Spektrum hervorgeht, ein Dimethylacetalmethylester.

Das UV-Absorptionsspektrum von (VII) deutet auf Grund eines Maximums bei 268 mμ (log ε 4,5) auf ein konjugiertes System von drei Doppelbindungen hin. Im

IR-Absorptionsspektrum ist bei 3520 cm^{-1} eine OH-Bande, bei 1740 cm^{-1} eine Estercarbonyl-Bande, sowie bei 1712 cm^{-1} eine intensive Bande sichtbar, wobei letztere durch Einführung von vier Wasserstoffatomen mittels katalytischer Hydrierung auf 1740 cm^{-1} verschoben wird. Die Bande bei 1712 cm^{-1} kann demnach auf eine zu zwei C-C-Doppelbindungen konjugierte Ester-Carbonyl-Gruppe zurückgeführt werden. Die Konstitution des konjugierten Systems lässt sich noch auf Grund der erwähnten Isolierung von α, α'-Dimethylpimelinsäure durch eine Methyl-Gruppe in α-Stellung ergänzen.

Das NMR-Spektrum des Dimethylacetals (VII) (s. Figur 8) zeigt im Bereich von $\delta = 1$ die Dublette (J = 7) von vier CH_3-CH-Gruppen. Das Signal der Methyl-

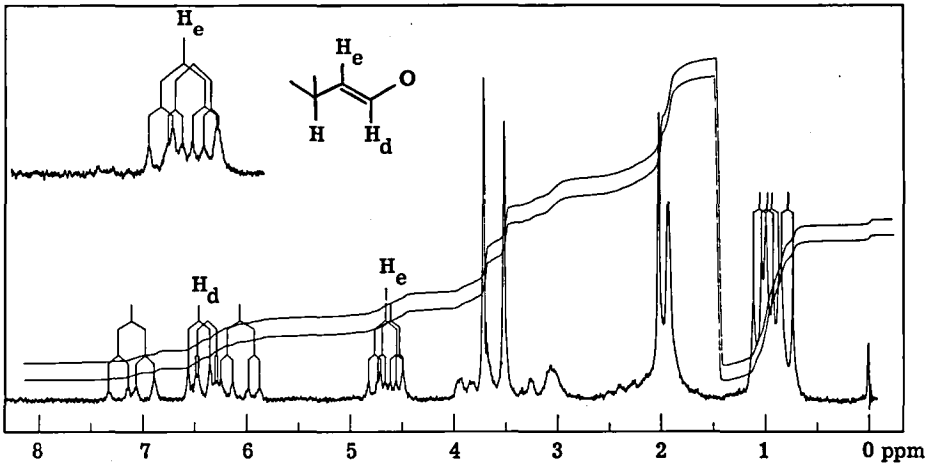


Figur 8 NMR-Spektrum des Dimethylacetals (VII)

Gruppe an C-C-Doppelbindung erscheint bei 1,92 (s, 3H) und wird durch Kopplung mit dem Proton an C-17 etwas verbreitert, ein scharfes Singlett bei 2,02(s, 3H) bestätigt die Anwesenheit einer Acetoxy-Gruppe, die beiden identischen Methoxyle der Dimethylacetal-Gruppierung geben Anlass zu einem Singlett bei 3,24(s, 6H) und die Carbomethoxy-Gruppe ist für das Singlett bei 3,69(3, 3H) verantwortlich. Das "Quadruplett" entsprechend dem X-Teil eines ABX-Systems bei 4,38 ($J_{AX} = 4,5$, $J_{BX} = 6,5$, 1H) ist auf das Proton am Acetal-Kohlenstoff zurückzuführen und weist durch seine Multiplizität auf die Nichtaequivalenz der zwei Protonen

A und B einer benachbarten Methylengruppe hin[8], ein anderes "Quadruplett" bei 4,58 (J_{AX} = 4,5, J_{BX} = 10,5, 1H) repräsentiert ebenfalls die X-Region eines ABX-Spektrums und entspricht dem Proton am acetoxy-substituierten Kohlenstoff. Die Signale bei 6,01 (m, J_1 = 15, J_2 = 6,5, 1H); 6,34 (m, J_1 = 11, J_2 = 1,5, 1H); und 7,06 (m, J_1 = 15, J_2 = 11, 1H) lassen sich anhand ihrer Aufspaltung den drei olefinischen Protonen (a), (b) und (c) (s. Figur 8), deren Stellung an drei benachbarten Kohlenstoffen bereits abgeleitet wurde, zuordnen und gestatten darüber hinaus die Geometrie beider Doppelbindungen zu eruieren. Das nochmals geringfügig aufgespaltene Dublett bei 6,34 kann nur dem Proton (a) entsprechen. Auf Grund dessen Aufspaltung durch das benachbarte Proton (b) mit einer Konstanten von J_{ab} = 11 muss deshalb das Signal von (b) ebenfalls die Aufspaltung von J_{ab} = 11 erfahren, die nur das Signal bei 7,06 aufweist und dasselbe also dem Proton (b) zuzuordnen erlaubt. Die aus der Multiplizität des letzteren Signals ersichtliche Kopplungskonstante J_{bc} = 15 findet sich auch im Signal bei 6,01 und weist dieses eindeutig dem Proton (c) zu. Die Grösse der Kopplungskonstante J_{bc} = 15 lässt keinen Zweifel offen, dass die beiden Wasserstoffe an der γ, δ-Doppelbindung trans zueinander stehen[8]. Wie aus J_{ab} = 11 ersichtlich, ist die Konformation um die β, γ,-Bindung antiperiplanar. Die geometrische Anordnung der Substituenten um die α, β-Doppelbindung lässt sich aus der Verschiebung des Signals von (b) gegenüber dem Signal von (a) um 0,7 cps in Richtung niederer Magnetfeldstärken ableiten. Untersuchungen von H. J. Jackman und Mitarb.[8, 19] an Doppelbindungsisomeren offenkettiger, konjugierter Ester zeigten nämlich, dass das Signal des zur Carbomethoxy-Gruppe cis-ständigen Protons, sowohl in β-, wie auch in γ-Stellung gegenüber demjenigen des transständigen Protons in Richtung niederer Feldstärken verschoben ist. Dieser durch die magnetische Anisotropie der Carbonyl-Gruppe hervorgerufene "Deshielding"-Effekt beweist die cis-Lage des Protons (b) zur Carbomethoxy-Gruppe und somit die angegebene sterische Anordnung der Substituenten um die α, β-Doppelbindung.

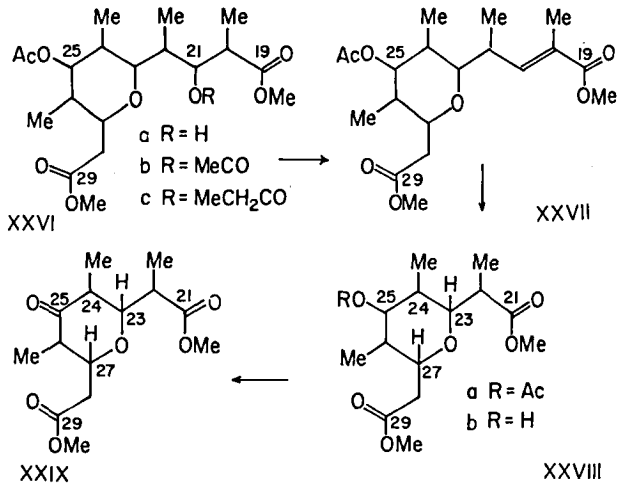
Wurde die Behandlung des Iminomethyläthers (V) mit 1-proz. methanolischer Salzsäure auf eine Stunde ausgedehnt, so resultierte in einer Ausbeute von etwa 10 % d. Th. eine Verbindung der Zusammensetzung $C_{24}H_{38}O_7$ (VIII) deren spektrales Verhalten diesselbe als Enolmethyläther-methylester charakterisiert. Im Einklang damit lässt sich die Verbindung (VIII) methanolytisch in den ausführlich beschriebenen Dimethylacetal-methylester (VII) überführen und aus letzterem durch Pyrolyse bei 300° unter Abspaltung von Methanol regenerieren. Der Enolmethyläther (VIII) zeigt



Figur 9 NMR-Spektrum des Enolmethyläthers (VIII)

unterschiedlich vom Dimethylacetal (VII) im IR-Absorptionsspektrum eine zusätzliche Bande bei 1677(m), sowie im NMR-Spektrum (Figur 9) die Signale zweier zusätzlicher olefinischen Protonen bei 6,47 (d, J = 12,5, 1H) respektive 4,67 (m, J_1 = 12,5, J_2 = 7, 1H) deren chemische Verschiebung (vergl. Seite 21) ihre Position an der Doppelbindung eines Enoläthersystems bestimmt. Aus der Multiplizität der beiden Signale folgt die Anwesenheit eines Methinprotons in Allylstellung, sowie die Tatsache, dass die zwei olefinischen Protonen trans zueinander angeordnet sind.

Weitere Einzelheiten der Konstitution konnten durch systematischen Abbau des Dimethylacetals (VII) gesichert werden. Durch Ozonisierung, Nachoxydation des Ozonisierungsproduktes mit Perameisensäure und Veresterung der erhaltenen Säure mit Diazomethan entsteht aus der Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ (VII) ein gesättigter Hydroxy-acetoxy-dimethylester $C_{19}H_{32}O_8$ (XXVIa) in dem das eine Carboxyl durch Ozonolyse der Doppelbindung zwischen C-18 und C-19 und das andere aus der Dimethylacetal-Gruppe am C-29 entstanden ist. Im NMR-Spektrum der Verbindung (XXVIa) sind bei δ = 1 die Dublette (J ~ 7) von vier CH_3-CH-Gruppen deutlich zu sehen, weiters die einer sekundären Acetoxy-Gruppe entsprechenden Signale bei 2,02(s, 3H) und



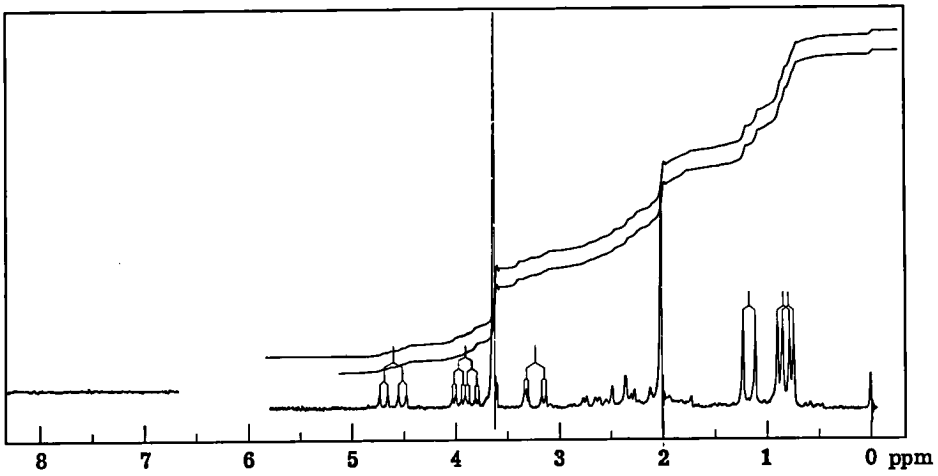
Formelschema 8

4,61(m, J_1 = 4,5, J_2 = 11, 1H) sowie das Signal der zwei Carbomethoxygruppen bei 3,62(s, 6H). Ein freies Hydroxyl liess sich durch das IR-Absorptionsspektrum (ν_{max} 3570 cm^{-1}) nachweisen, und durch Behandlung mit Acetanhydrid Schwefelsäure acetylieren. Das IR-Absorptionsspektrum des Acetyl-Derivates $C_{21}H_{34}O_9$ (XXVIb) zeigt die Abwesenheit von OH-Funktionen und das NMR-Spektrum die Signale der neu gebildeten sekundären Acetoxy-Gruppe bei 1,92(s, 3H) und 5,27(d, b, J = 8,5, 1H). Die vorhin beschriebenen NMR-Signale des Hydroxy-acetoxy-dimethylesters (XXVIa) sind im Spektrum von (XXVIb) bezüglich Lage und Aufspaltung unverändert. Die Pyrolyse des Diacetoxy-dimethylesters (XXVIb) bei 450° führte erwartungsgemäss [21] unter selektiver Elimination der β -ständigen Acetoxy-Gruppe zu einem α, β-ungesättigten Acetoxy-dimethylester $C_{19}H_{30}O_7$ (XXVII). Die konjugierte Doppelbindung ist anhand des IR-Absorptionsspektrum (ν_{max} 1716 (s), 1644(m) cm^{-1}), sowie des UV-Absorptionsspektrums (λ_{max} 219m (log ε 4,13) leicht nachzuweisen. Das NMR-Spektrum des α, β-ungesättigten Esters (XXVII) zeigt die Signale von drei CH_3-CH-Gruppen bei etwa δ = 1 sowie das geringfügig aufgespaltene Signal einer Methyl-Gruppe an doppelt gebundenen Kohlenstoff bei 1,8(d, J = 1,5, 3H). Die Anwesenheit einer sekundären Acetoxy-Gruppe beweisen die Signale bei 1,99(s, 3H) und 4,59(m, J_1 = 4,5, J_2 = 10,5, 1H). Das Signal des olefinischen Protons bei

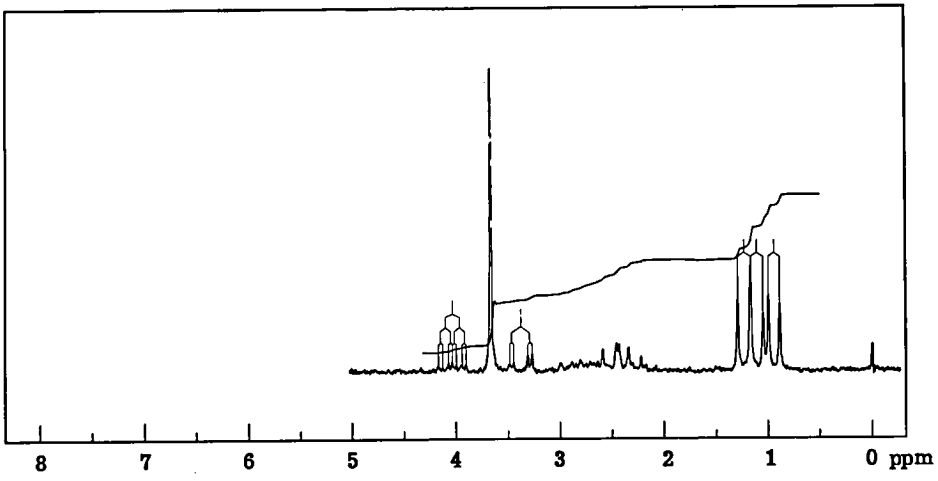
6,73(m, $J_1 = 10$, $J_2 = 1,5$, 1H) deutet auf Grund seiner chemischen Verschiebung[22] auf dessen cis-Position zur Carbomethoxy-Gruppe.

Bei dieser Abbaureihe stellte sich die Frage, ob bei der Pyrolyse die ursprüngliche oder die neueingeführte Acetyl-Gruppe abgespalten wurde. Diese Frage ist für die Lokalisierung der Acetyl-Gruppe in den Rifamycinen von Bedeutung. Aus diesem Grunde wurde das freie Hydroxyl im Hydroxy-acetoxy-dimethylester (XXVIa) mit Propionsäureanhydrid verestert und der so erhaltene Propionoxy-acetoxy-dimethylester (XXVIc) pyrolysiert. Es wurde dabei ausschliesslich unter Elimination von Propionsäure der gleiche α,β-ungesättigte Acetoxy-dimethylester (XXVII), wie aus Diacetoxy-dimethylester (XXVIb) erhalten. Die ursprüngliche Acetoxy-Gruppe kann demnach nicht am C-21 sitzen.

Der α,β-ungesättigte Acetoxy-dimethylester (XXVII) wurde durch Ozonisierung und Nachoxydation mit Perameisensäure nochmals abgebaut und die erhaltene Säure mit Diazomethan verestert. Das NMR-Spektrum (s. Figur 10) des so bereiteten Acetoxydimethylesters $C_{16}H_{26}O_7$ (XXVIIIa) zeigt im Bereich um $\delta = 1$ die Dubletts (J = 7) von drei CH_3-CH-Gruppen, bei 2,02(s, 3H) und 4,60(m, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 10,5$, 1H) die Signale einer sekundären Acetoxy-Gruppe, bei 3,62(s, 6H) das Singlett der zwei Carbomethoxy-Gruppen, sowie Signale bei 3,22(m, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 10,5$, 1H) und bei 3,90(m, $J_1 = 2$, $J_2 = 5,5$, $J_3 = 7,5$, 1H) die Methinprotonen am α-Kohlenstoff gesättigter Aether zukommen. Unter Berücksichtigung dieses NMR-Spektrums und der Konstitution der Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ (XXV) kann man für den Acetoxy-dimethylester $C_{16}H_{26}O_7$ die im Formelschema 8 wiedergegebene Formel XXVIIIa angeben, wobei einzig noch die Lage der Acetoxy-Gruppe respektive einer Methyl-Gruppe an C-24 oder C-25 ungewiss bleibt. Die Tetracarbonsäure kann nämlich, wie aus den bisherigen Untersuchungen hervorgeht aus keinem anderen Teil der Molekel stammen. Dementsprechend führten auch die Ozonisierung des Enolmethyläthers $C_{24}H_{38}O_7$ (VIII), nachfolgende Verseifung des Ozonolyseproduktes und Oxydation mit Salpetersäure zu der gleichen Tetracarbonsäure. Methanolytische Abspaltung des Acetyl-Restes im Acetoxy-dimethylester (XXVIIIa) ($C_{16}H_{26}O_7$) Oxydation des erhaltenen Hydroxy-dimethylesters (XXVIIIb) ($C_{14}H_{24}O_6$) mit dem Chromsäure-Pyridin-Komplex ergaben den Oxo-dimethylester (XXIX) ($C_{14}H_{22}O_6$. Der Vergleich des NMR-Spektrums von Oxo-dimethylester (Figur 11) mit demjenigen von Acetoxy-dimethylester (Figur 10) erlaubt, eindeutig die Position der Acetoxy- bzw. der Oxo-Gruppe am C-25 festzulegen. Man beachte besonders die Signale der zwei

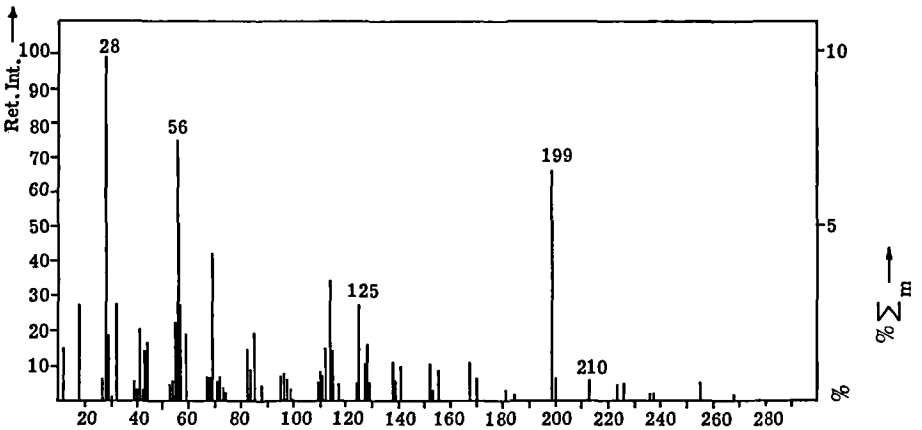


Figur 10 NMR-Spektrum des Acetoxydimethylesters (XXVIIIa)



Figur 11 NMR-Spektrum des Oxodimethylesters (XXIX)

Protonen neben dem Sauerstoff des Tetrahydropyranringes bei 3,22 und 3,90. Diese Signale zeigen in beiden Spektren die gleiche chemische Verschiebung und Aufspaltung, was kaum der Fall wäre, wenn die Acetoxy- bzw. Oxo-Gruppe am C-24 lokalisiert wäre. Das IR-Absorptionsspektrum (ν_{max} 1743(vs), 1715(s) cm^{-1}) und das Massenspektrum (Figur 12) des Oxo-dimethylesters sind mit Formel (XXIX) im

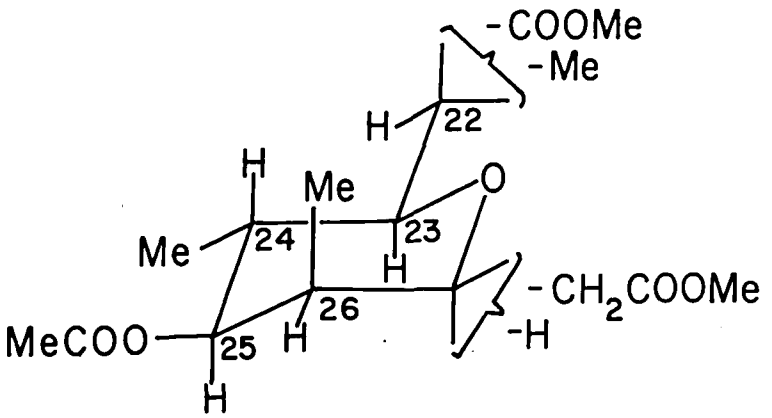


Figur 12 Massenspektrum des Oxo-dimethylesters XXIX

Einklang. Besonders erwähnenswert sind die Signale bei 213 $\frac{m}{e}$ und 199 $\frac{m}{e}$, die den infolge von Fragmentierung der Bindung C-27 - C-28, sowie der Bindung C-22 - C-23 entstandenen Ionen entsprechen. Das Signal bei 125 $\frac{m}{e}$ lässt sich dem durch Spaltung der beiden erwähnten Bindungen resultierendem Ion zuschreiben. Verschiedene andere Signale deuten auf Kombinationen dieser dominierenden Spaltung mit anderen Fragmentierungsreaktionen hin.

Nach Abschluss des Konstitutionsbeweises für die Verbindung $C_{25}H_{42}O_8$ (VII) und deren Abbauprodukte gestattete das NMR-Spektrum des Acetoxy-dimethylesters (XXVIIIa) (s. Figur 10) gewisse Schlüsse über die relative Konfiguration von vier Kohlenstoffen zu ziehen. Die Basis für diese Ueberlegungen bildeten die gut isolierten Signale der Methin-Protonen an C-22, C-23 und C-25, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung und Aufspaltung zugeordnet werden konnten. Die Kopplungs-

konstanten ermöglichten in Anbetracht der Tatsache, dass die Konstante der Spin-Spin-Kopplung vicinaler Protonen eine Funktion des von ihnen eingeschlossenen Winkels darstellt[23], folgendermassen die relative Konfiguration von C-23, C-24, C-25 und C-26 abzuleiten. Unter der Annahme, dass das "Oktett" bei 2,7 (J_1 = 2,5, J_2 = 7, 1H) dem Proton am C-22 entspricht, ist J_2 = 7 auf die Kopplung zwischen dem besagten Proton und den drei äquivalenten Methylprotonen des Methyls C-32



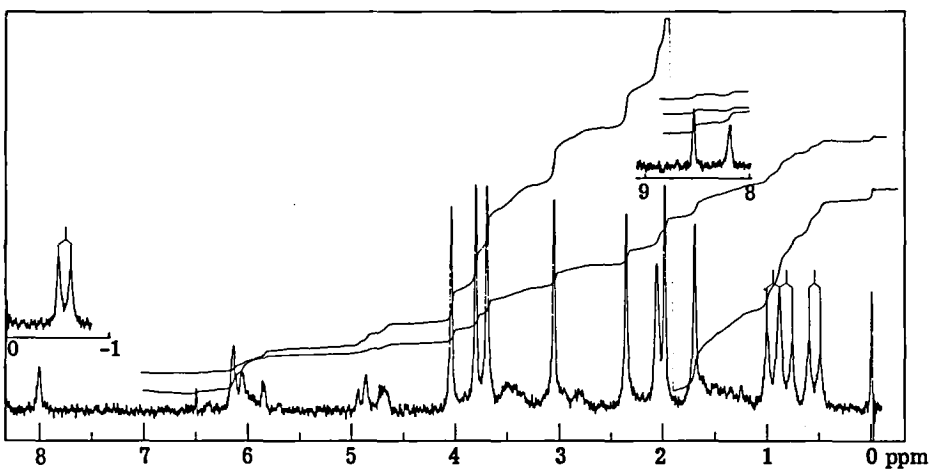
Figur 13 Räumliche Darstellung des Acetoxydimethylesters XXVIIIa

zurückzuführen, wie aus der Aufspaltung aller CH_3-CH-Signale mit J ~ 7 hervorgeht. Demnach beträgt die Kopplungskonstante zwischen den Protonen an C-22 und C-23 J_1 = 2,5. Das "Quadruplett" bei 3,22 (J_1 = 2,5, J_2 = 10,5, 1H) das dem Proton am C-23 zuzuordnen ist, offenbart auf Grund der daraus ersichtlichen Kopplung zwischen den Protonen an C-23 und C-24 mit einer Konstante von J = 10,5 deren axiale Anordnung. Das Proton am C-25, dem "Quadruplett" bei 4,60 (J_1 = 4,5, J_2 = 10,5, 1H) entsprechend, muss auf Grund der Konstante J_2 = 10,5, die auf der Kopplung mit dem axialen Proton am C-24 beruht, ebenfalls die axiale Lage einnehmen. Die Konstante der Kopplung zwischen den Protonen an C-25 und C-26 beträgt 4,5 cps, woraus die äquatoriale Lage des Protons am C-26 folgt.

E. Die ansa-Konstitution der Rifamycine

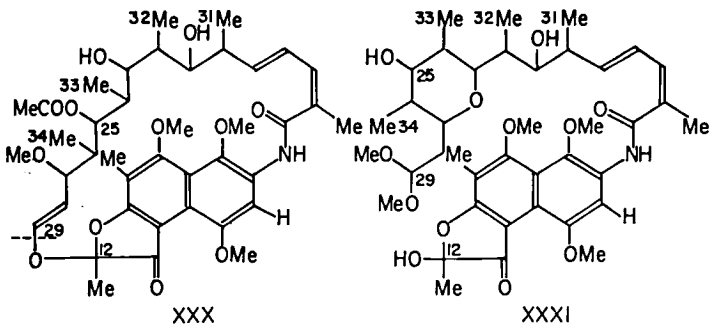
Einige wesentliche Informationen bezüglich der Verknüpfung des aromatischen Teiles mit der aliphatischen Kette in den Rifamycinen konnten bereits zu Beginn der Arbeit auf spektroskopischem Wege ermittelt werden. Den wichtigsten Hinweis darauf, dass nämlich die Rifamycine natürliche ansa-Verbindungen, in denen die aliphatische Kette den aromatischen Ring überbrückt, darstellen, ergab die Lage der Signale von zwei CH_3-CH-Gruppen im NMR-Spektrum des Rifamycin-S bei den abnormal hohen Magnetfeldstärken 0,22 bzw. 0,67. Dieser in fast allen Derivaten der Rifamycine beobachtete Effekt ist darauf zurückzuführen, dass die betreffenden Methyl-Protonen oberhalb der Ebene des Naphtochinon-Systems im Magnetfeld des aromatischen π-Elektronen-Kreisstromes zentral festgehalten werden und von diesem deshalb abgeschirmt sind, analog den mittleren zwei Methylen-Gruppen der Cyclophane [24].

Noch extremer, als bei Verbindungen vom Chinon-Typus ist die Abschirmung durch den Elektronen-Kreisstrom in Verbindungen vom Hydrochinon-Typus, wie z.B. bei 1-0,4-0,8-0-Trimethyl-rifamycin-SV. Im NMR-Spektrum dieses Derivates (s. Figur 14) befindet sich das Dublett einer Methyl-Gruppe bei -0,59 ppm, also ausserhalb des üblichen Messbereiches. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung,



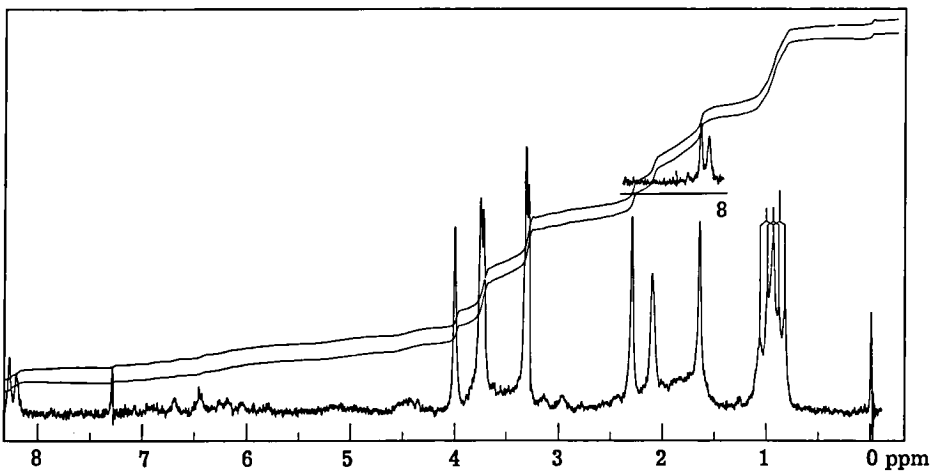
Figur 14 NMR-Spektrum des 1-0,4-0,8-0-Trimethyl-rifamycin-SV (XXX)

dass die abgeschirmten Methyl-Gruppen an einer aliphatischen Kette sitzen, die, an mindestens zwei Stellen mit dem aromatischen System verbunden ist und dieses überbrückt. Die Methanolyse von 1-0,4-0,8-0-Trimethyl-rifamycin-S führte zur



Formelschema 9

Spaltung zwischen C-29 und C-12 (siehe Seite 38). In der erhaltenen Verbindung (XXXI) deren Formel im Formelschema 9 und deren NMR-Spektrum in Figur 15 wiedergegeben sind, ist die Kette mit dem aromatischen System nur einseitig verknüpft. Erwartungsgemäss erscheinen nun die Dublette der Methyl-Gruppen C-31,



Figur 15 NMR-Spektrum der Verbindung (XXXI)

C-32, C-33 und C-34 zusammen in einem Signalhaufen, dessen Schwerpunkt bei etwa $\delta = 1$ liegt.

Auch die IR-Absorptionsspektroskopie lieferte ein weiteres Argument zur ansa-Struktur, anhand der unterschiedlichen Lage der Acetyl-Carbonyl-Bande im Rifamycin-S ($CHCl_3$): 1734 cm^{-1} und im Rifamycin-SV ($CHCl_3$): $\leq$ 1705 cm^{-1}. Die weitgehende Verschiebung der Acetyl-Carbonyl-Bande in den Rifamycin-Derivaten mit freier Hydroxyl-Gruppe am C-1 liess darauf schliessen, dass die Acetyl-Gruppe durch die aliphatische Brücke in der Nähe von C-1 festgehalten wird. Eine am C-1 befindliche Hydroxyl-Funktion kann in diesem Fall eine starke Wasserstoffbindung mit der Acetyl-Carbonyl-Gruppe eingehen und infolgedessen deren Schwingungsfrequenz in Richtung niederer Wellenzahlen verschieben *).

F. Verknüpfungsstellen der aliphatischen Brücke mit dem aromatischen Teil

Es bleibt noch die Aufgabe übrig, unter Berücksichtigung von im Laufe der Methanolyse des Iminomethyläthers (V) stattfindenden Konstitutionsänderungen aus der Konstitution der Methanolyse-Hauptprodukte diejenige der Rifamycine abzuleiten. Während über die Haftstellen am aromatischen Teil, - es kann sich nur um das Stickstoffatom am C-2 **) und um das Sauerstoffatom am C-12 handeln - und auch über die Verknüpfung des Carboxyls C-15 der Brücke mit dem Stickstoff in Form einer Carboxyamid-Gruppe kaum Zweifel bestehen, ist die zweite Haftstelle der Brücke nicht ohne weiteres ersichtlich, da bei der Methanolyse von (V) neben der Spaltung einer Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung und dem Verlust einer O-Methyl-Gruppe eine Ringschlussreaktion stattfindet, die einen Tetrahydropyran-Ring liefert. Es sei zuerst festgestellt, dass aus sterischen Gründen nur C-27 und C-29 als zweite Verknüpfungsstelle in Frage kommen. Ausserdem muss die aus den NMR-Spektren der Hydrierungsprodukte des Rifamycin-S (s. Figur 4) ersichtliche enolische "trans"-Doppelbindung zwischen C-28 und C-29 zu liegen kommen. Wird C-27 als Haftstelle

---

*) Modellbetrachtungen zeigten, dass Konstitution III und IV in der Tat den erwähnten räumlichen Erfordernissen gerecht werden.

**) Eine unter Annahme einer 1,2-Naphtochinongruppierung in Erwägung zu ziehende Position des Stickstoffs am C-4 würde die Lage der Brücke quer über dem aromatischen System verunmöglichen.

in Betracht gezogen so folgt zwangsläufig die Position der O-Methyl-Gruppe am ungesättigten Kohlenstoff C-29. Die chemische Verschiebung des Methoxyl-NMR-Signals in den Rifamycinen (δ : 3,1) entspricht jedoch einer O-Methyl-Gruppe an gesättigtem Kohlenstoff und die Lage des Signals ist auch nach Hydrierung der enolischen Doppelbindung im Spektrum des Hexahydro-rifamycin-S (XX) (vgl. Figur 4 mit Figur 5) unverändert. Somit bleibt nur mehr C-29 als Haftstelle übrig. Für die Lokalisierung der Methoxy-Gruppe sind nun die zwei Kohlenstoffe C-27 und C-23, an denen in den Abbauprodukten (VII) und (VIII) der Sauerstoff des Tetrahydropyran-Ringes sitzt ins Auge zu fassen. In Anbetracht der äusserst glatten Abspaltung des Methoxyls im Laufe der Methanolyse scheint für dieses die Allylstellung am C-27 wahrscheinlicher. Bei der sauren Methanolyse wäre dann der primäre Vorgang die Abspaltung des Methoxyls unter Entstehung eines durch Mesomerie stabilisierten Kations; es folgt der Angriff der am C-23 sitzenden Hydroxyl-Gruppe an C-27, wobei der Tetrahydropyran-Ring geschlossen wird und schliesslich die methanolytische Spaltung der Enoläther-Gruppe. Es können dabei prinzipiell zwei am C-27 epimere Verbindungen entstehen; die eine davon wäre das Dimethylacetal VII ($C_{25}H_{42}O_8$), die andere das erwähnte nicht eingehend aufgeklärte stereoisomere Isodimethylacetal. Die Bildung des Enomethyläthers (VII) *) bei der Methanolyse des Iminomethyläthers (V) kann durch Allylumlagerung des Methoxyls von C-27 nach C-29 und darauffolgender Tetrahydropyran-Ringbildung und Oeffnung der C-29-O-Bindung durch Angriff des C-23-Hydroxyls in Form einer SN'-Reaktion gedeutet werden.

Die nunmehr eindeutig abgeleiteten Konstitutionsformeln (I) bis (IV) ermöglichen gewisse Betrachtungen zur Biogenese der Rifamycine. Aus der Konstitution lässt sich vermuten, dass ein grosser Teil der Rifamycin-Molekel aus den biogenetischen Aequivalenten des Acetat- und Propionat- Ions (Acetyl-Coenzym A, Malonyl-Coenzym A bzw. Propionyl-Coenzym A, Methylmalonyl-Coenzym A) aufgebaut ist. Die Verteilung der Methyl-Gruppen und der Sauerstoff-Funktionen in der aliphatischen Brücke erinnern auffallend an die Konstitution gewisser Makrolide. Trotz dieser biogenetischen Verwandschaft stellen die Rifamycine einen neuen Typus von Stoffwechselprodukten der Actinomyceten dar und geben ein weiteres Zeugnis von der Kunstfertigkeit der Mikroorganismen, neuartige, ungewöhnliche Molekeln zu synthetisieren.

---

*) Das Dimethylacetal (VII) gibt in 1-proz. methanolischer Salzsäure keine nachweisbaren Mengen des Enolmethyläthers (VIII).

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Bemerkungen

Alle Dünnschichtchromatogramme wurden mit "Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie MERCK", aktiviert bei 140°, ausgeführt und die Flecke durch Besprühen mit Schwefelsäure und mehrstündigem Erhitzen auf 160° sichtbar gemacht. Zur präparativen Chromatographie diente, wenn nicht anders angegeben, das "Kieselgel 0,05 - 0,20 mm für Chromatographie MERCK". Die Papierchromatographie von Säuren wurde mit dem System n-Propanol-Ammoniak-Wasser (6:3:1) an WHATMAN-I-Papier durchgeführt; die Anfärbung der Flecken erfolgte mit Methylrot.

Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrographen Modell 21, die NMR-Spektren mit dem VARIAN A-60-Spektrometer (60 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ in ppm sind bezogen auf $\delta\ (CH_3)_4Si = 0$, die Kopplungskonstanten J sind angegeben in cps. Vergleichswerte findet man in L. M. Jackman, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spektroscopy in Organic Chemistry, Pergamon Press, London 1959.

Die Aufnahme der IR.-Absorptionsspektren erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 5-proz. Lösung; im allgemeinen werden die Banden der C-H-Schwingungen im 3μ-Gebiet, sowie Banden bei tieferen Wellenzahlen, als 1550 cm^{-1} nicht angeführt.

Die Absorptionsspektren im UV. und Sichtbaren wurden, wenn nicht anders vermerkt, in Feinsprit gemessen.

Alle Smp. sind nicht korrigiert.

Das optische Drehvermögen wurde im 1 dm Rohr gemessen.

B. Rifamycine und ihre Derivate

Rifamycin-O (II). Das Rifamycin-O von Lepetit wurde dreimal aus Methylenchlorid - Methanol umkristallisiert und zur Analyse 5 Tage bei $50^{o}/0,03$ Torr getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum (KBr): ν_{max} 1821(s), 1725(vs), 1680(w), 1655(s), 1630(s), 1600(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): Figur 2.

$C_{39}H_{47}O_{14}N$	Ber.	C 62,30	H 6,28	N 1,86	OCH_3 4,12	7 CCH_3 13,93 %
	Gef.	" 61,84	" 6,35	" 2,05	" 4,39	" 13,58 %

Rifamycin-S (III). Zur Analyse wurde das Rifamycin-S von Lepetit viermal aus Methanol umkristallisiert und 7 Tage bei $100^{o}/0,03$ Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren (0,1 N HCl in Feinsprit), λ_{max} in mμ (log ε): 219(4,51); 281(4,48); 340(3,92); 410(3,72). IR.-Absorptionsspektrum ($CHCl_3$): ν_{max} 3440(m), 3370(m), 1734(s), 1702(s), 1640(s), 1616(s), 1597(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): Figur 1. pK^{*}_{MCS}: 7,16. Das Rifamycin-S gibt einen dunkelroten Komplex mit Boressigsäureanhydrid.

$C_{37}H_{45}O_{12}N$	Ber.	C 63,87	H 6,52 %	Gef.	C 63,81 H 6,57 %

Tetrahydro-rifamycin-S (XIX). 10 g Rifamycin-S wurden mit 500 mg Palladium/Kohle-Katalysator in Aethanol 8 Stunden bei Normaldruck hydriert. Die Wasserstoffaufnahme (2,96 Mol H_2 pro Mol Rifamycin-S) kam nach 4 Stunden zum Stillstand. Nach Filtration durch Celit wurde das Filtrat eingedampft, der Eindampfrückstand in 1 l Methanol gelöst, eine Lösung von 40 g Natriumnitrit in 250 ml Wasser zugegossen und die Mischung anschliessend mit 2 N Salzsäure schwach angesäuert. Aus der Lösung fielen nach dem Abkühlen auf -10° 5 g dunkelgelbe Kristalle aus und nach dem Einengen im Vakuum weitere 4 g amorphes Pulver. Zur Analyse wurde die Probe viermal aus Methanol umkristallisiert und 7 Tage bei $100^{o}/$ 0,01 Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren (0,1 N HCl in Feinsprit), λ_{max} in mμ (log ε): 235(4,35); 280(4,32); 340(3,92); 415(3,67). Differential-UV.-Absorptionsspektrum Rifamycin-S/Tetrahydro-rifamycin-S (0,1 N HCl in Feinsprit) λ_{max} in mμ (log ε): 220(4,09); 256(4,04). IR.-Absorptionsspektrum (Nujol): ν_{max} 3440(m), 3380(m), 1740(s), 1705(s), 1642(s), 1625(s), 1602(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): Figur 4.

$C_{37}H_{49}O_{12}N$	Ber.	C 63,50	H 7,06	N 2,00 %
	Gef.	" 63,52	" 7,06	" 2,00 %

Hexahydro-rifamycin-S (XX). 6 g Rifamycin-S wurden in 60 ml Aethanol mit 1 g vorhydriertem Platin-Katalysator bei 21°/723 Torr in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Nach 15 Std. betrug die Wasserstoffaufnahme 4,8 Mol pro Mol Rifamycin-S. Zur Aufarbeitung wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Einer Lösung von 0,50 g des Rückstandes in 50 ml Methanol wurde die Lösung von 2,5 g Natriumnitrit in 12 ml Wasser zugesetzt und die Mischung mit 2 N Salzsäure schwach angesäuert. Nach dem Einengen im Vakuum fiel ein gelbbrauner Niederschlag aus, der nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen über Calciumchlorid 450 mg wog. Nach dreimaliger Kristallisation aus Methanol resultierten 56 mg orangegelbe Kristalle vom Smp. 161°, die zur Analyse 7 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurden. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren (0,1 N HCl in Feinsprit), λ_{max} in mμ (log ε): 236(4,41); 227(4,36); 337(3,97); 4,10(3,61). NMR-Spektrum($CDCl_3$): Figur 5.

$C_{37}H_{51}O_{12}N$ Ber. C 63,32 H 7,33 % Gef. C 63,29 H 7,41 %

Methylierung von Rifamycin-S. Eine Lösung von 40 g Rifamycin-S in 800 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 320 ml Methanol, 400 g Methyljodid und 60 g Silberoxyd 45 Min. am Rückfluss gekocht. Nach Filtration des Reaktionsgemisches durch Celit und Eindampfen des Filtrates konnte der Rückstand an 1,2 kg Kieselgel chromatographisch aufgetrennt werden, wobei man mit Chloroform - Aether (1 : 1) eluierte, Fraktionen zu 220 ml auffing und diese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 10 % Aceton) untersuchte.

Iminomethyläther (V). Die Fraktionen 11 - 12 enthielten 4 g einer orangegelben Substanz mit Rf 0,76, die sich aus Aether kristallisieren liess. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Aether wurden die Kristalle, Smp. 225°, zur Analyse 5 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 221(4,61); 279(4,41); 337(3,93); 4,05(3,65). IR.-Absorptionsspektrum ($CHCl_3$): ν_{max} 3510(m), 1725(s), 1655(m), 1632(vs), 1590(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum ($CDCl_3$): δ 0,70 (d, J = 7, 3 H); 0,75(d, J = 7, 3 H); 0,87(d, J = 7, 3 H); 1,04(d, J = 7, 3 H); 1,3 - 2,5(Signalhaufen, 5 H); 1,70(s, 3 H); 2,00(d, J = 1,2, 3 H); 2,08(s, 3 H); 2,23(s, 3 H); 2,5 - 3,6(Signalhaufen, 4 H); 3,15(s, 3H); 3,96(s, 3H) 4,2 - 6,3(Signalhaufen, 6H); 5,93 (s, 1H); 13,30(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: 9,38.

$C_{38}H_{47}O_{12}N$ Ber. C 64,30 H 6,67 % Gef. C 64,32 H 6,70 %

8-O-Methyl-rifamycin-S. Die Fraktionen 16-36 ergaben nach dem Eindampfen 32 g eines chromatographisch einheitlichen, (Rf 0,58), gelben Rückstandes, der zur Analyse zweimal aus Heptan umgefällt und eine Woche bei $100^{o}/0,03$ Torr getrocknet wurde. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren in mμ (log ε): max 220(4,48); max 264(4,40); sh 297(4,26); sh 347(3,88). IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3490(w), 3370(w), 1745(s), 1702(s), 1670(s), sh 1660(m), 1630(w), 1595(s), 1580(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum ($CDCl_3$): δ 0,18(d, J=7, 3H); 0,62(d, J=6,5, 3H); 0,80(d, J = 7, 3H); 0,93(d, J=7, 3H); 1,3 - 2,6(Signalhaufen, 5H); 1,67(s, 3H); 1,97(s, 3H); 2,03(s, 3H); 2,36(s, 3H); 2,6 - 3,6(Signalhaufen, 4H); 3,08(s, 3H); 3,94(s, 3H); 4,48(d, J = 10,5, 1H); 4,95(m, J_1 = 8, J_2=13, 1H); 5,5 - 6,4(Signalhaufen, 4H); 7,52(s, 1H); 8,28(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: Die Verbindung enthält keine saure Funktion.

$C_{38}H_{47}O_{12}N$ Ber. C 64,30 H 6,67 % Gef. C 64,05 H 6,98 %

8-O-Methyl-rifamycin-SV. 10 g 8-O-Methyl-rifamycin-S in 500 ml Methanol gelöst, wurden mit einer Lösung von 10 g Ascorbinsäure in 60 ml Wasser versetzt, nach 30 Min. mit 3 l Wasser verdünnt, zweimal mit je 500 ml Benzol ausgeschüttelt, die Benzolauszüge mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es resultierten 10 g eines tiefroten amorphen Rückstandes, der sich in 2 N Kaliumcarbonatlösung mit tiefblauer Farbe löst. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 226(4,67); 317(4,34); 470(3,62). pK^*_{MCS}: 9,87.

1-O,4-O,8-O-Trimethyl-rifamycin-SV (XXX). 2 Ansätze zu je 5 g 8-O-Methyl-rifamycin-SV wurden mit je 15 ml Methyljodid + 20 ml trockenem Aceton + 5 g trockenem Kaliumcarbonat 15 Std. im geschlossenem Rohr bei einer Temperatur von 113° geschüttelt. Der Rohrinhalt auf 500 ml Wasser gegossen, ergab jeweils nach Extraktion mit Aether, Trocknen und Eindampfen des Aetherauszuges 4,5 g eines orangefarbenen Rückstandes. Die insgesamt 9,0 g rohes Methylierungsprodukt wurden an 300 g Kieselgel mit Aether als Elutionsmittel chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 50 ml auffing und diese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Aether) untersuchte. Die Fraktionen 12 - 16 enthielten 2,1 g eines Gemisches, das als Hauptkomponente eine hellgelbe Substanz, Rf 0,44, und als Nebenkomponente eine orangefarbene Substanz, Rf 0,36, aufwies. Nach insgesamt fünfmaliger Chromatographie an Kieselgel mit Aether als Eluans konnten daraus 947 mg der hellgelben Substanz mit Rf 0,44 in chromatographisch reiner Form gewonnen werden. Zur Analyse wurde das amorphe Präparat 50 Std. bei $25^{o}/0,03$ Torr getrocknet.

Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 228(4,65); 295(4,50); 410(3,70). IR.-Absorptionsspektrum (CCl_4): ν_{max} 3500(m), 3420(m), 1717(vs), 1675(s), 1600(m) cm^{-1}. NMR-Spektrum (CCl_4): Figur 14.

$C_{40}H_{53}O_{12}N$ Ber. C 64,93 H 7,22 % Gef. C 64,70 H 7,47 %

Methanolyse von 1-0,4-0,8-0-Trimethyl-rifamycin-SV: (XXXI). 300 mg 1-0,4-0,8-O-Trimethyl-rifamycin-SV wurden in 2 ml 1-proz. methanolischer Salzsäure gelöst, die Lösung nach 15 Std. auf Wasser gegossen, mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug getrocknet und eingedampft. Der Rückstand liess sich an 16 g Kieselgel mit Aether als Eluans chromatographisch auftrennen, wobei die am langsamsten wandernde gelbe Zone getrennt eluiert, nach dem Eindampfen 119 mg eines festen Schaumes ergab. Zur Analyse wurden die 119 mg Eindampfrückstand einer zweiten Chromatographie an 16 g Kieselgel mit Aether als Elutionsmittel unterworfen und das dünnschichtchromatographisch (Aether, Rf 0,14) einheitliche amorphe Präparat 70 Std. bei $20^{o}/0,03$ Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 223(4,60); 288(4,52); 405(3,74). IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3620(w), 3490(m), 3420(m), 1705(vs), 1665(s), 1600(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum ($CDCl_3$): Figur 15.

$C_{39}H_{55}O_{12}N$ Ber. C 64,18 H 7,60 % Gef. C 63,84 H 7,74 %

1-0,4-O-Dimethyl-rifamycin-SV (XVII). Zwei Ansätze zu je 10 g Rifamycin-SV wurden mit je 50 g Methyljodid + 30 ml Aceton + 10 g Kaliumcarbonat im geschlossenem Rohr 15 Std. auf 100° erhitzt. Der Inhalt beider Rohre auf 600 ml Wasser gegossen, ergab nach Extraktion mit Aether, Trocknen und Eindampfen des Aetherauszuges insgesamt 14 g Rückstand. Dieser konnte an 500 g Kieselgel ("unter 0,08 mm", Merck) mit Aether als Eluans chromatographisch aufgetrennt werden, wobei eine orangefarbene Zone getrennt eluiert wurde, die 4,3 g einer dünnschichtchromatographisch (Aether, Rf 0,30) einheitlichen Substanz enthielt. Zur Analyse wurde der orangefarbene Schaum 7 Tage bei $70^{o}/0,01$ Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 230(4,60); 305(4,33); 440(3,60). IR.-Absorptionsspektrum ($CHCl_3$): ν_{max} 3400(m), 1705(s), 1665(vs), 1595(m), 1570(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum ($CDCl_3$): wie 1-0,4-0,8-O-Trimethyl-rifamycin-SV nur Signal bei δ 4,05(s, 3H) fehlt; dafür zusätzlich: δ 11,90(s, 1H) ppm. pK^{*}_{MCS}: keine Stufe.

$C_{39}H_{51}O_{12}N$ Ber. C 64,54 H 7,08 % Gef. C 64,72 H 7,49 %

1-0,4-O-Dimethyl-7-C-methyl-"rifamycin-SV" (XVIII). 4,2 g 1-0,4-O-Dimethyl-rifamycin-SV wurde mit 20 g Methyljodid + 20 ml Aceton + 4 g Kaliumcarbonat 15 Stunden im geschlossenem Rohr bei einer Temperatur von 100° geschüttelt. Der Rohrinhalt auf Wasser gegossen, mit Aether ausgeschüttelt, ergab nach dem Trocknen und Eindampfen des Aetherextraktes 4,1 g eines Rückstandes, der an 250 g Kieselgel mit Aether als Eluans chromatographiert wurde. Es konnte zuerst eine gelbe Zone, gefolgt von einer orangefarbenen Zone eluiert werden. Beide lieferten durch Kristallisation aus Aether insgesamt 700 mg hellgelbe Kristalle vom Smp. 188°, die zur Analyse dreimal aus Aether umkristallisiert und 50 Std. bei 80°/0,03 Torr getrocknet wurden. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 225(4,47); 242(4,62); 397(3,82). IR.-Absorptionsspektrum ($CHCl_3$): ν_{max} 3480(m), 3420(m), 1717(s), 1708(s), 1670(s), 1615(w), 1576(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ -0,05(d, J=7, 3H); + 0,65(d, J=7, 3H); 0,73(d, J=7, 3H); 1,04(d, J=7, 3H); 1,1 - 4,2(Signalhaufen, 7H); 1,55(s, 6H); 1,74(s, 3H); 2,07(s, 6H); 3,12(s, 3H); 3,72(s, 2H); 3,84(s, 3H); 3,96(s, 3H); 4,9 - 5,3(Signalhaufen, 2H); 5,8 - 6,4(Signalhaufen, 4H); 8,12(s, 1H); 8,63(s, 1H) ppm.

$C_{40}H_{53}O_{12}N$ Ber. C 64,93 H 5,73 % Gef. C 64,11 H 7,57 %

8-O-Methyl-20-0,23-O-diacetyl-rifamycin-S. Eine Lösung von 8 g 8-O-Methyl-rifamycin-S in 160 ml Acetanhydrid - Pyridin (1:1) wurde 14 Tage bei 20° im Dunkeln aufbewahrt und sodann auf Wasser gegossen. Nach 2 Std. wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Methylenchloridauszug mit 15-proz. wässriger Essigsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser mehrmals durchgeschüttelt, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand ergab nach zweimaliger Kristallisation aus Aether 6 g hellgelbe Kristalle. Zur Analyse wurde noch einmal aus Methylenchlorid-Hexan umkristallisiert und die Kristalle vom Smp. 252° 7 Tage bei 100°/0,01 Torr getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3360(m), 1735(vs), 1695(m), 1668(vs), 1635(m), 1593(vs), 1578(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ -0,10(d, J=7, 3H); + 0,70(d, J=7, 3H); 0,83(d, J=7, 3H); 0,97(d, J=7, 3H); 1,6 - 2,8(Signalhaufen, 2H); 1,75(s, 3H); 1,87(s, 3H); 1,95(s, 6H); 2,05(s, 3H); 2,34(s, 3H); 3,30(m, 1 H); 3,95(s, 3H); 4,4 - 5,3 (Signalhaufen, 4H); 5,5 - 6,3(Signalhaufen, 4H); 7,78(s, 1H); 8,26(s, 1H) ppm.

$C_{42}H_{51}O_{14}N$ Ber. C 63,54 H 6,48 % Gef. C 63,57 H 6,69 %

Triacetyl-rifamycin-SV. Einer Lösung von 15 g Rifamycin-SV in 150 ml Acetanhydrid wurde 10 ml Pyridin zugesetzt, nach einer Stunde eingeengt, 90 Min. mit 500 ml Wasser stehen gelassen, mit Chloroform ausgeschüttelt, der Chloroformauszug 15 Min. mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt, getrocknet und eingedampft. Wie das Dünnschichtchromatogramm (Chloroform + 10 % Aceton) zeigte, bestand das Reaktionsgemisch aus vier Komponenten (Rf 0,36; Rf 0,45; Rf 0,49; Rf 0,67). Durch zweimalige Kristallisation aus Aether konnten daraus 5 g hellgelbe Kristalle, Rf 0,45, vom Smp. 251° gewonnen werden. Die Mutterlauge enthielt die restlichen Komponenten. Zur Analyse wurde noch zweimal aus Aether umkristallisiert und die Probe bei 80°/0,03 Torr 7 Tage getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 229(4,50); 300(4,26); 360(3,38); 421(3,56). IR.-Absorptionsspektrum (Nujol): ν_{max} 3500(m), 1780(vs), 1730(vs), 1675(vs), 1640(m), 1605(w), 1575(w) cm^{-1}. IR.-Absorptionsspektrum in $CHCl_3$; 3μ-Bereich gedehnt: 5-proz. Lösung: ν_{max} 3508 cm^{-1}; 0,045-proz. Lösung: ν_{max} 3508 cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ -0,3(d, J=7, 3H); +0,75(d, J=6,5, 3H); 0,90(d, J=7, 3H); 1,00(d, J=7, 3H); 1,6 - 2,7(Signalhaufen, 4H); 1,81(s, 3H); 2,05(s, 6H); 2,12(s, 3H); 2,25(s, 6H); 2,40(s, 3H); 3,02(s, 3H); 2,7 - 4,1(Signalhaufen, 5H), 4,6 - 5,4(Signalhaufen, 2H); 5,5 - 6,7(Signalhaufen, 4H); 7,00(s, 1H); 11,20(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: keine Stufe sichtbar.

$C_{43}H_{53}O_{15}N$ Ber. C 62,68 H 6,48 % Gef. C 62,48 H 6,81 %

C. Reduktive Acetylierung von Triacetyl-rifamycin-SV

Die Lösung von 5 g Triacetyl-rifamycin-SV in 200 ml Acetanhydrid wurde mit 10 g Zinkstaub und 0,9 g wasserfreiem Natriumacetat versetzt, eine Stunde am Rückfluss gekocht, sodann auf Wasser gegossen, nach 90 Min. mit Chloroform ausgeschüttelt, der Chloroformauszug mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Im Dünnschichtchromatogramm (Aether + 20 % Aceton) des Rohproduktes zeigten sich unter anderem 2 Flecke, Rf 0,52 und Rf 0,20, die sich durch tiefblaue Fluoreszenz auszeichneten. Der Eindampfrückstand wurde durch Verteilungschromatographie an 500 g mit 450 ml der unteren Phase des Systems Heptan - Benzol - Methanol - Wasser (5:5:8:2) angefeuchtetem Celit aufgetrennt. Als Eluans dienten 2,5 l obere Phase des gleichen Systems und darauffolgend 1,5 l obere Phase des Systems Heptan - Benzol - Methanol -

Wasser (2:8:8:2), wobei man Fraktionen zu 150 ml auffing. Die Fraktionen 25 und 26 wurden eingedampft und der Rückstand (928 mg) einer erneuten Verteilungschromatographie an 150 g mit 135 ml der unteren Phase des Systems (2:8:8:2) angefeuchtetem Celit unterworfen. Als Elutionsmittel diente die obere Phase des gleichen Systems, wobei man Fraktionen zu 50 ml auffing. Die Fraktionen 8 - 12 ergaben nach dem Eindampfen 459 mg Rückstand (Rf 0,52), der sich aus Tetrachlorkohlenstoff kristallisieren liess. Die resultierenden winzigen farblosen Kristalle wiesen einen Smp. von 189° auf, der durch weitere 5 Kristallisationen aus Tetrachlorkohlenstoff auf 192° gesteigert werden konnte. Zur Analyse wurde das Präparat 7 Tage bei 60°/0,03 Torr getrocknet. UV.-Absorptionsspektrum, λ_{max} in mμ (log ε): 230(4,56); 252(4,55); 3,15(3,95); 325(3,95); 339(3,91). IR.-Absorptionsspektrum(KBr): ν_{max} 1765(vs), 1718(s), 1630(m), 1605(m) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ 2,29(s, 9H); 2,34 - 2,50(Signalhaufen, 15 H); 7,08(s, 1H) ppm. Molekulargewicht (CH_2Cl_2) Ber. 543,47 Gef. 555,1

$C_{26}H_{25}O_{12}N$	Ber.	C 57,45	H 4,63	N 2,58	8 C-CH_3	22,16 %
	Gef.	" 56,91	" 4,44	" 2,56	"	22,50 %

D. Kalischmelze von Tetrahydro-rifamycin-S

100 mg Tetrahydro-rifamycin-S wurden in einem Kugelrohr mit 500 mg festem Kaliumhydroxyd geschmolzen und die austretenden Gase durch 2 N Salzsäure geleitet. Die Operation wurde dreimal wiederholt. An den kühleren Teilen des Rohres kondensierte ein Oel (15 mg) des im Dünnschichtchromatogramm mindestens 8 Flecken zeigte. Die Lösung des Schmelzrückstandes in Wasser wurde mit Phosphorsäure angesäuert und einer Destillation mit Wasserdampf unterworfen. Im Destillat konnten nach Neutralisation mit Natronlauge und Eindampfen papierchromatographisch Essigsäure und Propionsäure nachgewiesen werden. Aus dem Rückstand der Destillation mit Wasserdampf liessen sich mit Aethylacetat 15 mg Säure mit Rf 0,63 ausschütteln, die über den Methylester mit Magnesiumanilid in das entsprechende Dianilid übergeführt wurde. Dieses erwies sich anhand des IR.-Absorptionsspektrums in KBr, sowie des Schmelzpunktes und Mischschmelzpunktes mit synthetischem meso-α, α'-Dimethylpimelinsäuredianilid identisch. Die vorgelegte 2 N Salzsäure wurde im Vakuum vorsichtig eingedampft. Der Rückstand konnte auf Grund eines papierchromatographischen Vergleichs (Phenol: Wasser 8:2) als Ammoniumchlorid identifiziert werden.

E. Abbau von Rifamycin-S mit Ozon

Zwei Ansätze zu je 2,5 g Rifamycin-S wurden in je 40 ml Methylenchlorid gelöst und bei -70° 45 Min. einem Ozonstrom ausgesetzt. Die blaue Lösung wurde jeweils eingedampft, der Rückstand in 20 ml 85-proz. Ameisensäure gelöst, 4 ml Perhydrol zugesetzt und die Mischung über Nacht stehen gelassen. Nach Behandlung mit Palladium/Kohle-Katalysator und mehrmaligem Eindampfen der vereinigten Ansätze mit Benzol wurde der Rückstand dreimal mit je 30 ml warmen Aceton ausgezogen, der acetonunlösliche Rückstand in heissem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und eingedampft. Es resultierten 566 mg Eindampfrückstand, der, wie auf Grund des Papierchromatogrammes folgte, (Rf 0,34, Rf 0,58) zwei Komponenten enthält. Dieses wurde an einer Cellulose-Säule (r = 1,2; h = 30 cm) mit dem System n-Propanol-Ammoniak-Wasser (6:3:1) voneinander getrennt, wobei man Fraktionen zu 6 ml auffing. Die Fraktionen 19-23 enthielten 393 mg eines Ammonsalzes mit Rf 0,58 und die Fraktionen 26 - 30 198 mg eines Ammonsalzes mit Rf 0,34.

4,6-Dihydroxy-5-methyl-benzol-(1,2,3)-tricarbonsäure.
Die 198 mg Ammonsalz Rf 0,34 wurden in Wasser gelöst an einer Säule von 10 ml Dowex-50(H^+-Form) in die freie Säure (151 mg) übergeführt. Nach dreimaligem Umlösen aus Wasser resultierten 80 mg farblose nadelförmige Kristalle vom Smp. 189°. 10 mg der Kristalle wurden 20 Std. bei 70°/0,05 Torr getrocknet. UV.-Absorptionsspektrum, λ_{max} in mμ (log ε): 239(4,46); 3,14(3,56). IR.-Absorptionsspektrum (KBr): ν_{max} 1710(s), 1678(s), 1605(s) cm^{-1}. pK^*_{MCS}: 3,59/5,55/9,60 Aequ.-gew.: Gef. 94.

Anhydrid. 20 mg Tricarbonsäure ergaben nach zweimaliger Sublimation bei 150 - 180°/0,05 Torr 15 mg schwach gelbliche Kristalle, Smp. 189°. IR.-Absorptionsspektrum(KBr): ν_{max} 1830(m), 1750(s), 1670(s), 1620(s) cm^{-1}.

$C_{10}H_6O_7$ Ber. C 50,43 H 2,54 % Gef. C 49,89 H 2,64 %

0,0'-Dimethyl-trimethylester (XI). In die Lösung von 50 mg der Tricarbonsäure in 2 ml Methanol wurde im Ueberschuss ätherische Diazomethanlösung eindestilliert, nach 10 Min. das Reaktionsgemisch eingedampft und die 70 mg Rückstand an 16 g Kieselgel mit Chloroform als Eluans chromatographiert. Nach dreimaliger Kristallisation aus Hexan resultierten 50 mg farblose nadelförmige Kristalle

vom Smp. 73°. Zur Analyse wurde 15 Std. bei 20°/0,05 Torr getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum(KBr): ν_{max} 1730(s), 1716(s), 1575(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum (CCl_4): δ 2,22(s, 3H); 3,79(s, 9H); 3,81(s, 6H) ppm.

$C_{15}H_{18}O_8$ Ber. C 55,21 H 5,56 % Gef. C 55,02 H 5,51 %

Zur Herstellung eines Vergleichspräparates wurde in eine Lösung von 4 mg 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure (XII) in 1 ml Methanol im Ueberschuss ätherischer Diazomethanlösung eindestilliert, das Reaktionsgemisch nach 10 Min. eingedampft und der Rückstand an 3 g Kieselgel mit Chloroform als Eluans chromatographiert. Nach zweimaliger Kristallisation aus Hexan resultierten 2 mg farblose Kristalle, die sich hinsichtlich des Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes und IR.-Absorptionsspektrums in KBr mit den 0,0'-Dimethyl-trimethylester (XI) identisch erwiesen.

Dicarbonsäure $C_{12}H_{10}O_8$ (XIIa). Die 393 mg Ammonsalz Rf 0,58 ergaben in Wasser gelöst und an einer Säule von 10 ml Dowex-50(H^+-Form) in die freie Säure übergeführt, 314 mg amorphes Pulver, das 24 Std. bei 70°/0,05 Torr getrocknet wurde. Die sauer reagierende Verbindung gibt eine Jodoform-Reaktion. UV.-Absorptionsspektrum, λ_{max} in mμ (log ε): 241(4,43); 300(3,87); 330(3,94). IR.-Absorptionsspektrum(KBr): ν_{max} 1725(s), 1690(s, b), 1607(vs) cm^{-1}. pK^*_{MCS}: 3,04/6,64. Aequ.-gew.: Gef. 150

0,0'-Diacetyl-dicarbonsäureanhydrid. Aus einer Lösung von 156 mg Dicarbonsäure (XIIIa) in 3 ml Acetanhydrid fiel nach Zusatz von 0,2 ml Pyridin innerhalb von 15 Std. ein feinkristalliner Niederschlag aus, der nach dem Abpipettieren der überstehenden Lösung im Vakuum bei 100° getrocknet wurde (106 mg). Nach dreimaliger Umkristallisation aus Benzol resultierten 65 mg farblose Kristalle vom Smp. 227°, die zur Analyse 50 Std, bei 70°/0,05 Torr getrocknet wurden. IR.-Absorptionsspektrum(KBr): ν_{max} 1856(s), 1777(s), 1745(s), 1632(m), 1603(m) cm^{-1}.

$C_{16}H_{12}O_9$ Ber. C 55,18 H 3,47 % Gef. C 55,55 H 3,42 %

0,0'-Dimethyl-dicarbonsäuredimethylester (XIII b). Eine Lösung von 144 mg Dicarbonsäure (XIIIa) in 30 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 10 ml Methanol, 10 ml Methyljodid und 1 g Silberoxyd 15 Std. am Rückfluss gekocht. Nach Filtration des Reaktionsgemisches durch Celit und Eindampfen des

Filtrates wurden die 172 mg Rückstand an 17 g Kieselgel ("unter 0,08 mm" Merck) mit Chloroform als Elutionsmittel chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 5 ml auffing und diese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Chloroform) untersuchte. Die Fraktionen 14 - 16 enthielten 110 mg einer neutralen Substanz Rf 0,66, die zur Analyse dreimal aus Hexan umkristallisiert und 20 Stunden bei $20^{o}/0,05$ Torr getrocknet wurde. Die farblosen nadelförmigen Kristalle schmelzen bei 109°. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 1735(vs), 1595(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4) δ 1,52(s, 3H); 2,25(s, 3H); 3,21(s, 3H); 3,80(s, 3H); 3,90(s, 6H) ppm.

$C_{16}H_{18}O_8$ Ber. C 56,80 H 5,36 % Gef. C 56,49 H 5,23 %

Dicarbonsäuredimethylester (XIII c). Die Suspension von 200 mg Dicarbonsäure (XIII a) in 4 ml Chloroform wurde nach Zusatz von 1 ml Methanol, 300 mg Methyljodid und 250 mg Silberoxyd 15 Std. im geschlossenem Rohr bei einer Temperatur von 70° geschüttelt. Nach Filtration des Rohrinhaltes wurde das Filtrat mit Methylenchlorid verdünnt, mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und eingedampft. Die 25 mg Eindampfrückstand zeigten im Dünnschichtchromatogramm (Methylenchlorid + 3 % Aceton) einen Fleck Rf 0,21 und ergaben nach chromatographischer Reinigung an 4 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Elutionsmittel 20 mg eines farblosen Harzes, das zur Analyse bei $180^{o}/0,01$ Torr destilliert wurde. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3450(m), 1732(s), 1675(s), 1604(s) cm^{-1}. 3-μ-Bereich gedehnt, 0,0166-proz. Lösung: 3570, 3460 (b) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 1,55(s, 3H); 2,10(s, 3H); 3,6 - 4,4 (Signalhaufen, 1H); 3,87(s, 3H); 3,90(s, 3H); 12,00(s, 1H) ppm.

$C_{14}H_{14}O_8$ Ber. C 54,19 H 4,55 % Gef. C 54,41 H 4,88 %

4-O-Methyl-6-O-acetyl-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (XIV). 15 mg Dicarbonsäuredimethylester (XIII c) wurden in 0,5 ml Aethanol gelöst und eine Lösung von 100 mg Natriummetaperjodat in 0,5 ml Wasser zugesetzt. Nach 5 Std. wurde die vormals neutrale nun aber sauer reagierende Lösung mit Wasser verdünnt, mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug getrocknet und eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde in 1 ml Methanol aufgenommen und mit einem Ueberschuss ätherischer Diazomethanlösung behandelt. Nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches resultierten 15 mg eines farblosen zähflüssigen Rückstandes, der im Dünnschichtchromatogramm (Methylenchlorid + 3 % Aceton) einen Fleck Rf 0,53 zeigte. Zur Analyse wurde die Substanz an 4 g Kie-

selgel chromatographisch gereinigt und anschliessend bei $160^{o}/0,01$ Torr destilliert. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 1780(s), 1240(vs), 1595(sh) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 2,11(s, 3H); 2,24(s, 3H); 3,78(s, 6H); 3,82(s, 6H) ppm.

$C_{16}H_{18}O_9$ Ber. C 54,24 H 5,12 % Gef. C 54,39 H 5,25 %

Methanolyse von (XIV). Eine Lösung von 52 mg des Acetyl-Derivates (XIV) in 8-proz. methanolischer Salzsäure wurde nach 40 Std. eingedampft, in die Lösung des Rückstandes in 1 ml Methanol im Ueberschuss ätherische Diazomethanlösung eindestilliert und das Reaktionsgemisch eingedampft. Der Eindampfrückstand (4,7 mg) erwies sich als einheitlich und zeigte das gleiche dünnschichtchromatographische Verhalten wie der 4,6-Dimethoxy-5-methyl-benzol-1,2,3-tricarbonsäure-trimethylester (XI). Nach chromatographischer Reinigung an 2 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Eluans und zweimaliger Kristallisation aus Hexan konnte anhand des Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes, sowie durch Vergleich der IR.-Absorptionsspektren in Chloroform die Identität der beiden Präparate sichergestellt werden.

F. Hydrierung des Chinondiazids aus Rifamycin-O

Chinondiazid (XV). 750 mg Rifamycin-O wurden in 20 ml Methanol nach Zusatz von 200 g p-Toluolsulfonylhydrazid 150 Min. am Rückfluss gekocht. Die dunkelbraune Lösung wurde auf Wasser gegossen, mit Benzol ausgeschüttelt, der Benzolauszug getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an 10 g Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Benzol + 20 % Aceton. Die ersten 30 ml des dunkelgefärbten Eluates ergaben nach dem Eindampfen 480 mg Rückstand, der im Dünnschichtchromatogramm (Methylenchlorid + 15 % Aceton) einen Fleck Rf 0,33 zeigte. Zur Analyse wurde zweimal aus Benzol kristallisiert und die filzigen hellgelben Kristalle eine Woche bei $100^{o}/0,01$ Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 230(4,59); 285(4,41); 318(4,38); 408(4,13). IR.-Absorptionsspektrum(Nujol): ν_{max} 3495(m); 3380(m), 2120(vs), 1730(sh), 1702(s), 1666(m), 1600(vs), 1575(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum ($CDCl_3$): δ 0,03(d, J=7, 3H); 0,64(d, J=7, 3H); 0,84(d, J=7, 3H); 1,01(d, J=7, 3H); 1,5 - 2,5(Signalhaufen, 4H); 1,74(s, 3H); 2,03(s, 3H); 2,06(s, 3H); 2,26(s, 3H); 2,8 - 3,9(Signalhaufen, 5H); 3,09(s, 3H); 4,79(d, J=10,5, 1H); 5,11(m, J_1=6,5,

J_2=12, 1H); 5,9 - 6,4(Signalhaufen, 4H); 8,64(s, 1H); 8,73(s, 1H); 15,50(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: 10,41.

$C_{37}H_{45}O_{11}N_3$	Ber.	C 62,79	H 6,41	N 5,95 %
	Gef.	" 62,73	" 6,57	" 5,43 %

4-Desoxy-tetrahydro-rifamycin-SV (XVI). Eine Suspension von 300 mg Chinondiazid (XV) in 10 ml Aethylacetat wurde nach Zusatz von 100 mg Palladium/Kohle-Katalysator über Nacht hydriert. Der abgelesene Wasserstoffverbrauch betrug 2,18 Mol pro Mol Chinondiazid. Nach Filtration durch Celit wurde das Filtrat eingedampft und der Rückstand einer Verteilungschromatographie unterworfen. Die Säule bestand aus 14 g Celit, der mit 12 ml der wässrigen Phase des Systems Heptan-Chloroform-Methanol-Wasser (5 : 5 : 6,6 : 3,3) getränkt war. Als Elutionsmittel diente die organische Phase des gleichen Systems. Die ersten 20 ml des gefärbten Eluates wurden getrennt aufgefangen und eingedampft. Der Rückstand wurde an 14 g Kieselgel ("unter 0,08 mm", Merck) mit Chloroform + 50 % Aceton als Eluans chromatographiert und sobald das Eluat Fluoreszenz zeigte, 20 ml davon aufgefangen und eingedampft. Die 52 mg Eindampfrückstand ergaben nach dreimaligem Umkristallisieren aus Benzol-Heptan (1:1) 44 mg hellgelbe Kristalle, Smp. 172°, die zur Analyse 1 Woche bei 100°/0,01 Torr getrocknet wurden. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 217(4,36); 239(4,36); 290(4,32); sh 325(3,79); 409(4,09). IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3470(m), 3400(m), 3180(b,w), 1705 sh, 1690(s), 1645(m), 1627(m), 1585(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(Deuteroaceton): Figur 3, in $CDCl_3$ zusätzliche (in Deuteroaceton nicht sichtbare) Signale: 8,27(s, 1H); 12,10(s, 1H); 12,70(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: 4,44.

$C_{37}H_{51}O_{11}N$	Ber.	C 64,80	H 7,50	N 2,04 %
	Gef.	" 64,74	" 7,69	" 2,04 %

G. Oxydation der Hydrierungsprodukte von Rifamycin-S mit Salpetersäure

3 g Tetrahydro-rifamycin-S wurden mit 30 ml 40-proz. wässriger Salpetersäure 40 Min. auf 105° erhitzt. Nach dem Einengen der Lösung wurde 5 ml Ameisensäure zugesetzt und das Gemisch wiederholt mit Ligroin eingedampft. Der honigartige Eindampfrückstand (2,62 g) wurde dreimal mit je 50 ml heissem Benzol ausgezogen. Das benzolunlösliche Säuregemisch zeigte im Papierchromatogramm zwei dominierende Flecken (Rf 0,34 und Rf 0,27). Die vereinigten Benzolauszüge lieferten 1,20 g Säuregemisch. Auf Grund des Papierchromatogramms waren darin hauptsächlich 4 Komponenten (Rf 0,63; Rf 0,52; Rf 0,49; Rf 0,44) nachweisbar.

Auftrennung des benzollöslichen Säuregemisches. Das benzollösliche Säuregemisch (1,20 g) liess sich durch Verteilungschromatographie auftrennen. Die Säule bestand aus 300 g Kieselgel (Mallinckrodt "100 mesh") das mit 180 ml Wasser verrieben und mit Chloroform eingeschlämmt wurde. Eluiert wurde successive mit 2 l Chloroform, 2 l Chloroform + 5 % n-Butanol und 2 l Chloroform + 10 % n-Butanol (alle Systeme wassergesättigt), wobei man Fraktionen zu 100 ml auffing.

Fraktion	mg	Rf
1 - 17	330	0,63
22 - 28	115	0,52
31 - 36	185	0,49
45 - 59	96	0,44

Methylbernsteinsäure (XXIV). Durch Sublimation bei 80°/0,03 Torr von 30 mg aus den Fraktionen 46 - 58 (Rf 0,44) konnten 21 mg farblose Kristalle erhalten werden, die nach dreimaliger Umkristallisation aus Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff, Smp. 111 - 113°, zur Analyse noch einmal im HV sublimiert wurden.
pK^*_{MCS}: 6,67/8,10. $[\alpha]^{20}_{D} = \pm 0^{o}$ (c = 2,15, Wasser).

$C_5H_8O_4$ Ber. C 45,45 H 6,10 % Gef. C 45,60 H 6,28 %

Zur Identifizierung wurden 10 mg Säure mit Diazomethan in den Methylester übergeführt. Das daraus mit einem Ueberschuss von Magnesiumanilid in Aether hergestellte Dianilid erwies sich nach dreimaliger Kristallisation aus Benzol anhand

des Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes und IR.-Absorptionsspektrums mit synthetisch hergestelltem Methylbernsteinsäure-dianilid identisch.

α-Methylglutarsäure (XXIII). 39 mg kristalliner Eindampfrückstand aus den Fraktionen 31 - 34 (Rf 0,49) wurde bei 80°/0,03 Torr destilliert. Nach dreimaliger Kristallisation des Destillates aus Benzol-Hexan resultierten 22 mg farblose Plättchen vom Smp. 73 - 76°. pK^*_{MCS}: 6,12/8,79. $[\alpha]^{20}_{D} = +6,5°$ (c = 2,75, Wasser).

$C_6H_{10}O_4$ Ber. C 49,31 H 6,90 % Gef. C 49,29 H 6,90 %

Das IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform war identisch mit demjenigen einer synthetisch hergestellten racemischen α-Methylglutarsäure. Die beiden Präparate waren auch im Papierchromatogramm nicht unterscheidbar.

α-Methyladipinsäure (XXII). 19 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 22 - 28 (Rf 0,52) wurden mit einem Ueberschuss Diazomethan behandelt. Das aus dem rohen Methylester mit Magnesium anilid hergestellte Anilidgemisch wurde in Aether suspendiert und vom Ungelösten abzentrifugiert. Der Eindampfrückstand (18 mg) der klaren ätherischen Lösung ergab nach chromatographischer Reinigung an 4 g Aluminiumoxid der Aktivität II mit Benzol-Chloroform(1:1) als Elutionsmittel und viermaliger Kristallisation aus Benzol-Aethanol 10 mg Kristalle vom Smp. 177°, die zur Analyse 3 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurden.

$C_{19}H_{22}O_2N_2$ Ber. C 73,52 H 7,15 % Gef. C 73,57 H 7,27 %

Die Identität mit synthetischem α-Methyladipinsäure-dianilid konnte auf Grund des IR.-Absorptionsspektrums in KBr, Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes, sowie durch dünnschichtchromatographischen Vergleich erwiesen werden.

α, α'-Dimethylpimelinsäure (XXI)

p-Phenyl-phenacylester. 50 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 1 - 17 (Rf 0,63) wurden in üblicher Weise mit p-Phenyl-phenacylbromid umgesetzt und das Reaktionsgemisch an 12 g Kieselgel mit Benzol + 2 % Aethylacetat als Elutionsmittel aufgetrennt. Die dünnschichtchromatographisch (Benzol + 1 % Aethylacetat) einheitlichen Fraktionen mit Rf 0,68 wurden vereinigt und dreimal aus Aether im eingeschmolzenem Rohr umkristallisiert. Der so gereinigte Ester schmilzt bei 118°

und wurde zur Analyse 15 Stunden bei $60^{o}/0,03$ Torr getrocknet.

$C_{37}H_{36}O_6$ Ber. C 77,06 H 6,44 % Gef. C 76,86 H 6,46 %

Dimethylester. 50 mg Eindampfrückstand aus den Fraktionen 1 - 17 wurden mit einem Ueberschuss ätherischer Diazomethanlösung behandelt. Nach dem Eindampfen des Reaktionsgemisches wurde der Rückstand zur Analyse dreimal bei $65^{o}/0,03$ Torr destilliert. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,63 - 1,92(Signalhaufen, 6H); 1,10(d, J=6,5, 6H); 2,00 - 2,78(Signalhaufen, 2H); 3,37(s, 6H) ppm.

$C_{11}H_{20}O_4$ Ber. C 61,09 H 9,32 % Gef. C 61,16 H 9,26 %

Trennung der diastereomeren Dianilide. 16 mg Säuregemisch aus den Fraktionen 1 - 17, das ein optisches Drehvermögen $[\alpha]_D^{20} = +15,2^{o}$ (c = 9,22, Chloroform) aufwies, wurde über die Säurechloride in die Anilide übergeführt. Das rohe Anilidgemisch (40 mg) wurde in Benzol auf 10 g Aluminiumoxid der Aktivität II aufgetragen. Mit Benzol konnten 15 mg eines rechtsdrehenden Dianilids eluiert werden, das nach viermaliger Kristallisation aus Benzol bei 172 - 174° schmilzt. $[\alpha]_D^{20} = +100^{o}$ (c = 1,42, Chloroform).

$C_{21}H_{26}O_2N_2$ Ber. C 74,52 H 7,75 % Gef. C 74,39 H 7,74 %

Mit Benzol + 4 % Chloroform liessen sich 10 mg eines optisch inaktiven Dianilids eluieren, das nach viermaliger Kristallisation aus Benzol Kristalle vom Smp. 192° lieferte. $[\alpha]_{20}^{D} = \pm 0^{o}$ (c = 1,31, Chloroform).

$C_{21}H_{26}O_2N_2$ Ber. C 74,52 H 7,75 % Gef. C 74,60 H 7,81 %

Das optisch inaktive Dianilid mit dem Smp. 192° erwies sich auf Grund des Mischschmelzpunktes und IR.-Absorptionsspektrums in KBr identisch mit synthetisch hergestellten meso-α, α'-Dimethylpimelinsäure-dianilid. Zur Herstellung des Vergleichspräparates wurde das synthetische Gemisch aus meso-Form und racemischer Form der α, α'-Dimethylpimelinsäure über die Säurechloride in die entsprechenden Dianilide übergeführt und nach Kipping[17] durch fraktionierte Kristallisation aus Aethanol das schwerer lösliche meso-Dianilid abgetrennt.

Auftrennung des benzolunlöslichen Säuregemisches. Zu einer Lösung des benzolunlöslichen Säuregemisches in 30 ml Wasser wurde bis zur schwach alkalischen Reaktion gesättigte Calciumhydroxidlösung eingetropft, vom Niederschlag abgenutscht und das Filtrat durch eine Säule von 50 ml Dowex-50(H^+-Form) fliessen

gelassen. Nach Eindampfen des Eluates blieben 864 mg Rückstand (Hauptkomponente: Rf 0,27). Der Niederschlag wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, mit Aethylacetat ausgeschüttelt, der Aethylacetatauszug gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand erwies sich nach mehrmaliger Kristallisation aus Wasser in jeder Hinsicht mit Oxalsäure identisch.

Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ (XXV). Der durch Eindampfen des Eluates erhaltene Rückstand (864 mg) wurde einer Verteilungschromatographie an 300 g, mit 180 ml Wasser befeuchtetem Kieselgel (Mallinckrodt "100 mesh") unterworfen. Als Eluans dienten successive 1 l Chloroform mit 10 % n-Butanol, 1 l Chloroform mit 20 % n-Butanol und schliesslich 1 l Chloroform mit 30 % n-Butanol. Alle Systeme waren wassergesättigt. Mit Chloroform + 30 % n-Butanol konnten 200 mg einer farblosen Säure Rf 0,27, eluiert, und daraus durch viermalige Kristallisation aus Aethylacetat 15 mg winzige Kristalle vom Smp. 207° erhalten werden. pK^*_{MCS}: 5,51/9,44. Aequ.-gew.: Ber. 69,5 Gef. 75,0

$C_{10}H_{14}O_9$ Ber. C 43,17 H 5,07 % Gef. C 42,91 H 4,99 %

Tetramethylester. In eine Lösung von 7 mg kristalliner Tetracarbonsäure in 1 ml Methanol wurde im Ueberschuss ätherische Diazomethanlösung eindestilliert, das Gemisch eingedampft und der zähflüssige Rückstand zur Analyse bei 120°/0,01 Torr destilliert. IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 1742(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): Figur 6.

Abbau der Tetracarbonsäure (XXV). Der Eindampfrückstand der Mutterlauge aus der letzten Kristallisation der Tetracarbonsäure (28 mg) wurde mit 2 ml 65-proz. Bromwasserstoffsäure im geschlossenem Rohr 2 Stunden auf 130° erhitzt, wobei teilweise Verkohlung stattfand. Der Rohrinhalt ergab nach dem Eindampfen 23 mg Rückstand, dessen Lösung in 5 ml Feinsprit nach Zusatz von 1 ml 2 N Kaliumhydroxidlösung und 30 mg Palladium/Kohle über Nacht in Wasserstoffatmosphäre gerührt wurde. Nach Filtration durch Celit wurde eingeengt, mit 20 ml Wasser verdünnt, angesäuert und mehrmals mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen des Aetherauszuges resultierten 8 mg Rückstand, der sich papierchromatographisch gleich, wie α-Methylbernsteinsäure verhielt. Dieser lieferte nach Behandlung mit Diazomethan und anschliessend mit Magnesiumanilid 12,4 mg Anilidgemisch, das in Methylenchlorid auf eine Säule von 3 g Kieselgel aufgetragen

wurde. Als Elutionsmittel diente Methylenchlorid + 10 % Aceton, wobei man Fraktionen zu 3 ml auffing. Die Fraktionen 6 - 9 enthielten 5 mg Anilid, das nach zweimaligem Umkristallisieren aus Benzol im Dünnschichtchromatogramm von synthetischem α-Methylbernsteinsäuredianilid nicht unterscheidbar war. Auch die IR.-Absorptionsspektren der beiden Präparate in Chloroform waren identisch.

β-Acetoxy-α, γ, η-trimethyl-azelainsäure-dimethylester.
4 g des bei der Hydrierung von Rifamycin-S in Gegenwart von Platin-Katalysator anfallenden Gemisches (s. Hexahydro-rifamycin-S) wurden in einer Mischung von 16 ml 100-proz. Salpetersäure + 24 ml Eisessig 30 Min. auf 90 - 100° erhitzt und anschliessend im Vakuum zur Trockene eingedampft. Die papierchromatographische Untersuchung des Eindampfrückstandes (3,55 g) zeigte die gleichen Flecken, wie das durch Oxydation von Tetrahydro-rifamycin-S mit wässriger Salpetersäure erhaltene Gemisch, sowie einen neuen Fleck Rf 0,70. Das Säuregemisch wurde auf eine Säule von 300 g mit 180 ml Wasser befeuchtetem Kieselgel (Mallinckrodt "100 mesh") aufgetragen, mit 2,5 l Chloroform eluiert und das Eluat eingedampft. Der Eindampfrückstand (2,1 g) liess sich durch Verteilungschromatographie an einer Säule auftrennen, die aus 250 g mit 220 ml der polaren (unteren) Phase des Systems Heptan-Chloroform-Methanol-Wasser (5:5:5,5:4,5) angefeuchtetem Celit bestand. Als Eluans diente die apolare Phase des gleichen Systems. Es wurden Fraktionen zu 50 ml aufgefangen, die Fraktionen 16 - 22 vereinigt, eingedampft und die 248 mg Eindampfrückstand (Rf 0,70) mit einem Ueberschuss ätherischer Diazomethanlösung behandelt. Nach dem Eindampfen des Gemisches wurde der Rückstand bei 135°/0,03 Torr destilliert, die 80 mg Destillat an 16 g Kiesel ("unter 0,08 mm", Merck) mit Chloroform als Eluans chromatographiert und Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Der Inhalt der Fraktionen 20 - 23 (20 mg) wurde zur Analyse bei 135°/0,03 Torr destilliert. NMR-Spektrum(CCl_4): 0,90(d, J=7, 3H); 1,08(d, J=7, 3H); 1,13(d, J=7, 3H); 0,80 - 1,80(Signalhaufen, 7H); 1,97(s, 3H); 2,1 - 2,9(Signalhaufen, 2H); 3,60(s, 6H); 4,95(m, J_1=5, J_2=7, 1H) ppm. Massenspektrum: Figur 7.

$C_{16}H_{28}O_6$	Ber.	C 60,74	H 8,92	2 OCH_3	19,62 %
	Gef.	" 60,31	" 8,33	"	19,37 %

Abbau von β-Acetoxy-α, γ, η-trimethyl-azelainsäure-dimethylester. 18 mg des Dimethylesters wurden in einem 8 mm weitem Pyrexrohr bei 0,05 Torr siebenmal durch einen auf 470° erhitzten Glaswollpropfen destilliert. Im Dünnschichtchromatogramm ($CHCl_3$) liess sich fast kein Ausgangsmaterial (Rf 0,49), dagegen eine neue Verbindung (Rf 0,62) nachweisen. Die 4 mg Destillat ergaben nach chromatographischer Reinigung an 4 g Kieselgel mit Chloroform als Eluans 2,5 mg eines α, β-ungesättigten Esters mit Rf 0,62. UV.-Absorptionsspektrum: λ_{max} 220 mμ (log ε 4,4). In eine Lösung von 1 mg des α, β-ungesättigten Esters in 5 ml Methylenchlorid wurde bei -70° bis zur Blaufärbung Ozon eingeleitet, sodann das Methylenchlorid vorsichtig im Vakuum entfernt, der Rückstand 1 Std. mit 1 ml Wasser gekocht, mit Aether extrahiert, der Aetherauszug getrocknet und eingedampft. Nach 15-stündiger Behandlung des Eindampfrückstandes mit 1 ml 90-proz. Ameisensäure + 0,1 ml Perhydrol, wurde die überschüssige Persäure mit Platin-Katalysator zerstört, 5 ml Wasser zugesetzt, mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug eingedampft und 1 Std. mit 1 ml 10-proz. wässriger Kalilauge gekocht. Die nach dem Ansäuern des Reaktionsgemisches durch Ausziehen mit Aether gewonnene Säure erwies sich papierchromatographisch einheitlich und nicht unterscheidbar von α, α'-Dimethylpimelinsäure (XXI).

H. Methanolyse des Iminoäthers aus Rifamycin-S

3,9 g Iminomethyläther (V) wurden in 30 ml 1-proz. methanolischer Salzsäure gelöst, wobei sich die Lösung schon nach wenigen Sekunden tiefrot färbte. Nach 1 Std. wurde das Reaktionsgemisch auf 300 ml Eiswasser gegossen, mit 2 N Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und mit Methylenchlorid 2,9 g neutrale Anteile (s. Seite 59) ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase konnten nach dem Ansäuern mit 2 N Salzsäure 823 mg dunkelrote rohe Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ abzentrifugiert werden.

Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ (VI). Der dunkelrote Niederschlag wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen über Calciumchlorid zur Analyse zweimal aus Methanol umkristallisiert und 18 Std. bei 135°/0,05 Torr getrocknet. Die violettroten Kristelle verkohlen bei Temperaturen über 200° ohne zu schmelzen. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 228(4,42); 273(4,26);

311(4,04); 350(4,05). IR.-Absorptionsspektrum(Nujol): ν_{max} 3320(s), 1725(s), 1660(s), 1610(vs), 1598(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CF_3COOH): δ 1,93(s, 3H); 2,37(s, 3H); 6,55(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS} = 7,12. Mikrotitration mit 0,1 N $HClO_4$ in Eisessig: pK^*_{AcOH} = 6,96.

$C_{14}H_{11}O_6N$	Ber.	C 58,13	H 3,83	N 4,84 %
	Gef.	" 58,22	" 3,68	" 5,13 %

Methylierung der Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$. 800 mg der Verbindung (VI) wurden mit 30 ml Aceton, 20 ml Methyljodid und 3 g Kaliumcarbonat 15 Std. im geschlossenem Rohr bei einer Temperatur von 100° geschüttelt. Nach dem Abkühlen wurde der Rohrinhalt auf Wasser gegossen, mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, der Methylenchloridauszug getrocknet und eingedampft. Der Rückstand konnte an 32 g Kieselgel durch Elution mit Methylenchlorid + 5 % Aceton chromatographisch aufgetrennt werden, wobei man Fraktionen zu 15 ml auffing und diese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 5 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 10 - 11 enthielten 71 mg eines einheitlichen Produktes mit Rf 0,55. Die in den Fraktionen 12 - 20 enthaltenen 333 mg eines Gemisches von zwei Komponenten mit Rf 0,55 respektive Rf 0,49 wurde einer weiteren Chromatographie an 70 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Eluans unterzogen, wobei man Fraktionen zu 33 ml auffing. Die Fraktionen 10 - 11 enthielten 14 mg einer orangeroten Substanz mit Rf 0,55 und die Fraktionen 13 - 18 250 mg einer orangegelben Substanz mit Rf 0,49.

0,0'-Dimethyl-N,N-dimethyl-derivat (IX b). Die insgesamt 85 mg Substanz mit Rf 0,55 lieferten nach Kristallisation aus Aether 83 mg orangeroter Kristalle vom Smp. 164°, die zur Analyse bei 110°/0,03 Torr getrocknet wurden. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε): 207(4,35); 236(4,31); 282(4,27); 458(3,69). IR.-Absorptionsspektrum ($CHCl_3$): ν_{max} keine OH-Banden, 1700(s), 1680(s), 1608(s), 1565(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ 2,27(s, 3H); 2,57(s, 3H); 3,18(s, 6H); 3,72(s, 3H); 3,88(s, 3H); 5,53(s, 1H) ppm.

$C_{18}H_{19}O_6N$	Ber.	C 62,60	H 5,55 %	Gef.	C 62,61	H 5,62 %

0,0'-Dimethyl-N-methyl-derivat (IX a). Die 250 mg Substanz mit Rf 0,49 wurden aus Heptan-Benzol umkristallisiert und die resultierenden orangefarbenen Kristalle, vom Smp. 154° zur Analyse 5 Tage bei 110°/0,03 Torr getrocknet. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, λ_{max} in mμ (log ε):

230(4,45); 277(4,30); sh 306(4,08); sh 360(3,53); 465(3,56). IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3395(m), 1700(s), 1678(s), 1615(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ 2,30(s, 3H); 2,65(s, 3H); 2,91(d, J=5,5, 3H); 3,80(s, 3H); 3,88(s, 3H); 5,56(s, 1H); 6,38(m, 1H) ppm.

$C_{17}H_{17}O_6N$	Ber.	C 61,63	H 5,17	N 4,23 %
	Gef.	" 61,86	" 5,21	" 4,55 %

5-Pyruvoyl-6,8-dimethoxy-2-hydroxy-7-methyl-naphtochinon (1,4) (X). 103 mg des 0,0'-Dimethyl-N-methyl-derivates (IXa) wurden in 60 ml 10-proz. wässriger Salzsäure bei 65° gerührt, sodann mit Methylenchlorid extrahiert und der Methylenchloridauszug mit 2 N Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt. Die Methylenchloridlösung ergab nach dem Eindampfen 28 mg unverändertes Ausgangsmaterial. Aus der Natriumhydrogencarbonatlösung konnten mit Methylenchlorid nach dem Ansäuern 70 mg einer gelben stickstoffreien Verbindung ausgeschüttelt werden. Nach zweimaliger Kristallisation aus Benzol resultierten 60 mg Kristalle vom Smp. 170°, die zur Analyse 7 Tage bei 100°/0,03 Torr getrocknet wurden. Die Lösung der Substanz in Methanol färbt sich nach Zusatz von wässriger Titan(III)-chloridlösung tiefdunkelblau. Absorptionsspektrum im UV. und Sichtbaren, (0,1 N HCl in Feinsprit), λ_{max} in mμ (log ε): 215(4,27); 262(4,24); 298(4,19); 369(3,79). IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3360(m), 1705(s), 1660(vs), 1638(s), 1570(s) cm^{-1}. 0,166-proz. Lösung, 3μ-Bereich gedehnt: ν_{max} 3360 cm^{-1}. NMR-Spektrum($CDCl_3$): δ 2,24(s, 3H); 2,56(s, 3H); 3,68(s, 3H); 3,80(s, 3H); 6,03(s, 1H) ppm. pK^*_{MCS}: 4,23. Aequ.-gew. Ber. 318,2 Gef. 304.

$C_{16}H_{14}O_7$	Ber.	C 60,38	H 4,43 %	Gef.	C 60,30	H 4,37 %

Auftrennung der neutralen Anteile der Methanolyse. Die 2,9 g neutrale Anteile (s. Seite 55) aus 3,9 g Iminomethyläther liessen sich an 100 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Eluans chromatographisch auftrennen, wobei man Fraktionen zu 17,5 ml auffing und diese mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 5 % Aceton) untersuchte.

Enolmethyläther $C_{24}H_{38}O_7$ (VIII). Die Fraktionen 12 - 13 enthielten 371 mg einer zähflüssigen Substanz mit Rf 0,70, die zur Analyse bei 195°/0,001 Torr destilliert wurde. UV.-Absorptionsspektrum: λ_{max} 268 (log ε 4,37) mμ. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3540(m), 1742(s), 1712(s), 1677(w), 1658(m), 1639(w), 1605(w) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): Figur 9.

$C_{24}H_{38}O_7$ Ber. C 65,73 H 8,73 % Gef. C 65,29 H 8,79 %

Dimethylacetal $C_{25}H_{42}O_8$ (VII). Die Fraktionen 15 - 25 ergaben insgesamt 906 mg eines farblosen zähflüssigen Harzes, Rf 0,50, das zur Analyse vorsichtig bei 200°/0,001 Torr destilliert wurde. UV.-Absorptionsspektrum: λ_{max} 268 mμ (log ε 4,48). IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3520(m), 1742(s), 1712(s), 1640(w), 1607(w) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): Figur 8. $[\alpha]_D^{20} = -52,5°$ (c = 0,61, $CHCl_3$).

$C_{25}H_{42}O_8$ Ber. C 63,80 H 9,00 % Gef. C 63,56 H 8,92 %

Hydrierung des Dimethylacetals. 847 mg Dimethylacetal wurden in einer Mikrohydrierapparatur mit Hilfe von 11 mg vorhydriertem Platin-Katalysator in Feinsprit bei Normaldruck hydriert, wobei die Wasserstoffaufnahme, die nach 80 Min. zum Stillstand kam, 2,00 Mol pro Mol Dimethylacetal betrug. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators durch Celit und Eindampfen des Filtrats wurde der Rückstand vorsichtig bei 200°/0,001 Torr destilliert. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3550(m), 1740(vs), 1467(m) cm^{-1}.

$C_{25}H_{46}O_8$ Ber. C 63,26 H 9,77 % Gef. C 63,03 H 9,67 %

Ueberführung des Dimethylacetals in den Enolmethyläther. 200 mg Dimethylacetal wurden in einem 8 mm weitem Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 300° erhitzten Glaswollpropfen destilliert. Das Destillat (150 mg) wurde an 40 g Kieselgel chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 10 ml auffing und diese dünnschichtchromatographisch (Methylenchlorid + 5 % Aceton) untersuchte. Die Fraktion 10 enthielt 23 mg einer Substanz mit Rf 0,68 die im Dünnschichtchromatogramm das gleiche Verhalten, wie der Enolmethyläther (VIII) zeigte; die beiden Präparate gaben auch identische IR.-Absorptionsspektren in CCl_4. Aus den Fraktionen 12 - 25 konnten 109 mg unverändertes Dimethylacetal zurückgewonnen werden.

Ueberführung des Enolmethyläthers in das Dimethylacetal. 40 mg durch einstündige Methanolyse des Iminomethyläthers erhaltener Enolmethyläther wurde in 1 ml 1-proz. methanolischer Salzsäure gelöst. Nach 1 Std. wurden 20 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung zugegossen und mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen und Eindampfen des Aetherauszuges wurde der Rückstand an 3 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Elutionsmittel chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 2 ml auffing. Die Fraktion 5 enthielt noch 0,5 mg unveränderten Enolmethyläther. Die Fraktionen 6 - 8 ergaben nach dem Eindampfen 22 mg einer Substanz, die hinsichtlich ihres dünnschichtchromatographischen Verhaltens, sowie des IR.-Absorptionsspektrums in CCl_4 von dem durch Methanolyse des Iminomethyläthers erhaltenem Dimethylacetal nicht unterscheidbar war.

Isodimethylacetal $C_{25}H_{42}O_8$. 1 g Iminomethyläther wurden in 5 ml 1-proz. methanolischer Salzsäure gelöst. Nach 15 Min. wurde die Lösung auf Wasser gegossen, mit 2 N Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und mit Methylenchlorid 725 mg neutrale Anteile ausgeschüttelt. Aus der wässrigen Phase konnten nach dem Ansäuern 210 mg der rohen Verbindung $C_{14}H_{11}O_6N$ abzentrifugiert werden. Die 725 mg neutralen Anteile zeigten im Dünnschichtchromatogramm (Methylenchlorid + 5 % Aceton) neben etwas am Startort verbliebenem Material zwei Flecken mit Rf 0,50 respektive Rf 0,30. Die chromatographische Auftrennung in die beiden Komponenten erfolgte an 30 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Elutionsmittel, wobei Fraktionen zu 10 ml aufgefangen wurden. Die Fraktionen 9 - 15 enthielten 310 mg der Komponente mit Rf 0,50, die sich anhand des Dünnschichtchromatogramms sowie des IR.-Spektrums in CCl_4 identisch mit dem Dimethylacetal (VII) erwies. Die Fraktionen 20 - 25 ergaben 95 mg der Komponente mit Rf 0,30, die zur Analyse bei $190^o/0,01$ Torr destilliert wurde. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3530(m), 1740(s), 1710(s), 1640(m), 1607(w) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,91(d, J=7, 6H); 0,97(d, J=7, 6H); 1,5 - 2,9(Signalhaufen, 7H); 1,92(s, 3H); 2,01(s, 3H); 3,0 - 4,2(Signalhaufen, 3H); 3,23(s, 3H); 3,27(s, 3H); 3,70(s, 3H); 4,45(m, J_1 = 4,5, J_2=6,5, 1H); 4,72(m, J_1 =4, J_2=7,5, 1H); 6,00(m, J_1=7, J_2=15, 1H); 6,35(m, J_1=11, J_2=1,5, 1H); 7,10(m, J_1=15, J_2=11, 1H) ppm.

$C_{25}H_{42}O_8$ Ber. C 63,80 H 9,00 % Gef. C 63,73 H 8,98 %

Tetracarbonsäure $C_{10}H_{14}O_9$ (XXV) aus Enolmethyläther. In eine Lösung von 371 mg Enolmethyläther (VIII) in 30 ml Methylenchlorid wurde 30 Min. bei -40° Ozon eingeleitet, die Lösung vorsichtig eingedampft, der Rückstand in 5 ml Ameisensäure gelöst, 1 ml Perhydrol zugesetzt und das Reaktionsgemisch 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zerstörung der überschüssigen Persäure mit Palladium/Kohle, Filtration durch Celit, blieben nach dem Eindampfen 305 mg eines Harzes zurück, das nach einstündigem Kochen mit 30 ml 2 N Salzsäure 270 mg eines teilweise kristallinen Produktes lieferte. Dieses wurde in 1 ml 50-proz. wässriger Salpetersäure 45 Min. auf 105° erhitzt. Nach Reduktion der überschüssigen Salpetersäure mittels Ameisensäure und mehrmaligem Abdampfen unter Zusatz von Benzol erhielt man 203 mg eines Säuregemisches, das durch Verteilungschromatographie aufgetrennt wurde. Die Säule bestand aus 60 g Kieselgel (Mallinckrodt 100 mesh) das mit 36 ml Wasser verrieben und mit Chloroform eingeschlämmt wurde. Als Elutionsmittel diente von Fraktion 1 - 21 Chloroform + 10 % n-Butanol, von Fraktion 22 - 56 Chloroform + 20 % n-Butanol und ab Fraktion 57 Chloroform + 30 % n-Butanol, wobei alle Systeme wassergesättigt waren, Fraktionen zu 15 ml aufgefangen und diese papierchromatographisch untersucht wurden. Die Fraktionen 42 - 64 ergaben 40 mg einer Säure mit Rf 0,27, die nach einmaliger Kristallisation aus Aethylacetat 15 mg farbloser Kristalle vom Smp. 202 - 204° und $[\alpha]_D^{20} = +41°$ (c = 0,70, Wasser) lieferte. Nach einer weiteren Kristallisation aus Aethylacetat wiesen die winzigen Kristalle einen Smp. von 204 - 206° und $[\alpha]_D^{20} = +38,5°$ (c = 0,61, Wasser) auf und gaben mit der durch Oxydation aus Tetrahydro-rifamycin-S erhaltenen Tetracarbonsäure keine Smp.-Erniedrigung.

J. Systematischer Abbau des Dimethylacetals $C_{25}H_{42}O_8$ (VII)

Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{19}H_{32}O_8$ (XXVI a). In eine Lösung von 900 mg Dimethylacetal in Methylenchlorid wurde 30 Min. bei -30° Ozon eingeleitet, vorsichtig eingedampft, der Rückstand in 5 ml 85-proz. Ameisensäure gelöst, 1 ml Perhydrol zugesetzt und die Mischung 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zerstörung der überschüssigen Persäure mit Palladium-Katalysator, Filtration durch Celit und Eindampfen des Filtrates, wurde in die Lösung des Rückstandes in 2 ml Methanol im Ueberschuss ätherische Diazomethanlösung eindestilliert und das Reaktionsgemisch eingedampft. Die 828 mg Rück-

stand konnten an 70 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Eluans chromatographisch aufgetrennt werden, wobei man Fraktionen zu 20 ml auffing und diese mittels der Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 10 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 11 - 18 enthielten 403 mg einer einheitlichen zähflüssigen Verbindung mit Rf 0,64, die zur Analyse bei 160°/0,001 Torr destilliert wurde. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 3570(m), 1743(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum (CCl_4): δ 0,79(d, J=6,5, 3H); 0,92(d, J=7, 3H); 0,95(d, J=7, 6H); 1,5 - 2,6(Signalhaufen, 5H); 2,02(s, 3H); 2,77(s, b, 1H); 3,17(m, J_1=2, J_2=10, 1H); 3,62(s, 6H); 3,6 - 4,1(Signalhaufen, 2H); 4,61(m, J_1=4,5, J_2=4,5, J_2=11, 1H) ppm. $[\alpha]_D^{20}$ = - 53,6° (c = 1,48, Feinsprit).

$C_{19}H_{32}O_8$ Ber. C 58,74 H 8,30 % Gef. C 58,69 H 8,31 %

Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{21}H_{34}O_9$ (XXVI b). Eine Lösung von 360 mg des Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters (XXVI a) in 10 ml Acetanhydrid wurde nach Zusatz von 10 Tropfen konz. Schwefelsäure 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen und sodann in 50 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung gegossen. Nach 1 Std. wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, der Methylenchloridauszug mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die chromatographische Reinigung des Rohproduktes (366 mg) erfolgte an 30 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Elutionsmittel, wobei man Fraktionen zu 10 ml auffing und diese mittels Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 2 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 8 - 16 enthielten 334 mg einer Substanz mit Rf 0,32, die nach dreimaliger Kristallisation aus Hexan bei 93° schmilzt. Zur Analyse wurde die Kristalle 15 Std. bei 70°/0,03 Torr getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 1741(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,77(d, J=6,5, 3H); 0,85(d, J=7, 3H); 1,03(d, J=7, 3H); 1,11(d, J=7, 3H); 1,6 - 2,8(Signalhaufen, 6H); 1,92(s, 3H); 2,03(s, 3H); 2,97(m, J_1=2,2, J_2=10,5, 1H); 3,60(s, 3H); 3,62(s, 3H); 3,5 - 4,1(Signalhaufen, 1H); 4,57(m, J_1=4,5, J_2=10,5, 1H); 5,27(d, J=8,5, 1H) ppm. $[\alpha]_D^{20}$ = - 41,9° (c = 1,46, Feinsprit).

$C_{21}H_{34}O_9$ Ber. C 58,59 H 7,96 % Gef. C 58,72 H 8,01 %

α,β-Ungesättigter Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{14}H_{30}O_7$ (XXVII). 294 mg Diacetoxy-dicarbonsäuredimethylester wurden in einem 8 mm weitem Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 450°

erhitzten Glaswollepropfen destilliert. Das Destillat wurde an 20 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 2 % Aceton als Eluans chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 10 ml auffing und diese dünnschichtchromatographisch (Methylenchlorid + 5 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 7 - 9 enthielten 43 mg einer Substanz mit Rf 0,50. Mit Methylenchlorid + 5 % Aceton konnten 186 mg Ausgangsmaterial eluiert werden, das erneut unter den gleichen Bedingungen pyrolysiert und aufgetrennt wurde. Nach einer weiteren Pyrolyse des nicht umgesetzten Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters resultierten insgesamt 114 mg der Verbindung mit Rf 0,50, die nach zweimaliger Kristallisation aus Pentan bei 79° schmilzt. Zur Analyse wurden die Kristalle bei 50°/0,01 Torr getrocknet. UV.-Absorptionsspektrum: λ_{max} 219 mμ (log ε 4,13). IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 1742(s), 1716(s), 1648(w) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,73(d, J=7, 3H); 0,86(d, J=7, 3H); 1,05(d, J=7, 3H); 1,80(d, J=1,5, 3H); 1,99(s, 3H); 1,3 - 2,9(Signalhaufen, 5H); 3,08(m, J_1=2,2, J_2=10,5, 1H); 3,63(s, 3H); 3,80(s, 3H); 3,5 - 4,2(Signalhaufen, 1H); 4,59(m, J_1=4,5, J_2=10,5, 1H); 6,73(m, J_1=10, J_2=1,5, 1H) ppm. $[\alpha]_D^{20}$ = -40,6° (c = 1,06, Feinsprit).

$C_{19}H_{30}O_7$ Ber. C 61,60 H 8,16 % Gef. C 61,41 H 8,23 %

Propionyloxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester (XXVI c). Eine Lösung von 106 mg des Hydroxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters (XXVI a) in 5 ml Propionsäureanhydrid wurde nach Zusatz von 5 Tropfen konz. Schwefelsäure 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen, sodann auf 50 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung gegossen. Nach 1 Std. wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, der Methylenchloridauszug mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die chromatographische Reinigung des Rohproduktes (110 mg) erfolgte an 30 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 5 % Aceton als Elutionsmittel, wobei man Fraktionen zu 10 ml auffing und diese mittels der Dünnschichtchromatographie (Methylenchlorid + 5 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 8 - 15 enthielten 90 mg einer Substanz mit Rf 0,38, die vor der spektroskopischen Untersuchung mehrmals mit Tetrachlorkohlenstoff eingedampft wurde.
NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,77(d, J=7, 3H); 0,83(d, J=7, 3H); 1,00(d, J=7, 3H); 1,07(t, J=7, 3H); 1,12(d, J=7, 3H); 1,5 - 2,8(Signalhaufen, 8H); 2,02(s, 3H); 2,95(m, J_1=2,2, J_2=10,5, 1H); 3,59(s, 3H); 3,61(s, 3H); 3,80(m, 1H); 4,56(m, J_1=4,5, J_2=10,5, 1H); 5,27(d, J=9, 1H) ppm.

Pyrolyse: 82 mg Propionyloxy-acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester wurden in einem 8 mm weitem Pyrexrohr bei 0,01 Torr durch einen 80 mm langen auf 450° erhitzten Glaswollepfropfen destilliert. Die chromatographische Auftrennung des Destillates erfolgte an 15 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 1 % Aceton als Elutionsmittel, wobei man Fraktionen zu 10 ml auffing und diese dünnschichtchromatographisch (Methylenchlorid + 2 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 12 - 17 enthielten 42 mg einer aus Pentan kristallisierbaren Substanz mit Rf 0,50, die sich nach dreimaliger Kristallisation aus Pentan auf Grund des Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes, NMR-Spektrums und IR.-Absorptionsspektrums identisch mit dem α, β-ungesättigten Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester (XXVII) aus Diacetoxy-dicarbonsäure-dimethylester (XXVIb) erwies.

Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{16}H_{26}O_7$ (XXVIII a). In eine Lösung von 100 mg des α, β-ungesättigten Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters $C_{14}H_{30}O_7$ in 30 ml Methylenchlorid wurde bei -75° bis zur Blaufärbung Ozon eingeleitet und sodann 10 Min. mit Stickstoff gespült. Nach vorsichtiger Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 5 ml 85-proz. Ameisensäure gelöst, 1 ml Perhydrol zugesetzt und das Gemisch 15 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Zerstörung der überschüssigen Persäure mit Palladium/Kohle und wiederholtem Eindampfen des Gemisches mit Benzol, wurde die Lösung des Eindampfrückstandes in Methanol durch Celit filtriert und in das Filtrat im Ueberschuss ätherische Diazomethanlösung eindestilliert. Das resultierende Estergemisch (80 mg) wurde an 60 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 2 % Aceton als Elutionsmittel chromatographiert, wobei man Fraktionen zu 20 ml auffing und diese dünnschichtchromatographisch (Methylenchlorid + 2 % Aceton) untersuchte. Die Fraktionen 9 - 13 enthielten 50 mg einer zähflüssigen Substanz mit Rf 0,46, die zur Analyse bei 130°/0,01 Torr destilliert wurde. IR.-Absorptionsspektrum(CCl_4): ν_{max} 1749(vs) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): Figur 10. $[\alpha]_D^{20} = -42,7°$ (c = 0,64, Feinsprit).

$C_{16}H_{26}O_7$ Ber. C 58,17 H 7,93 % Gef. C 58,15 H 8,00 %

Hydroxy-dicarbonsäure-dimethylester $C_{14}H_{24}O_6$ (XXVIII b). 40 mg des Acetoxy-dicarbonsäure-dimethylesters (XXVIIIa) wurden mit 5 ml 8-proz. methanolischer Salzsäure 1 Std. am Rückfluss gekocht und sodann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (35 mg) zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Methylen-

chlorid + 10 % Aceton) einen Fleck, Rf 0,37, und ergab nach chromatographischer Reinigung an 15 g Kieselgel mit Methylenchlorid + 10 % Aceton als Eluans 33 mg einer langsam durchkristallisierenden Substanz. Zur Analyse wurde die Substanz zweimal aus Hexan umkristallisiert und die Kristalle vom Smp. 88° 15 Std. bei 40°/0,01 Torr getrocknet. IR.-Absorptionsspektrum($CHCl_3$): ν_{max} 3600(m), 3530(w, b), 1732(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): δ 0,82(d, J=7, 3H); 0,88(d, J=7, 3H); 1,16(d, J=7, 3H); 1,4 - 2,2(Signalhaufen, 2H); 2,2 - 2,9(Signalhaufen, 4H); 3,12(m, J_1=2,5, J_2=10, 1H); 3,37(m, J_1=4,5, J_2=10,5, 1H); 3,65(s, 6H); 3,80(m, 1H) ppm.

$C_{14}H_{24}O_6$ Ber. C 58,31 H 8,39 % Gef. C 58,48 H 8,59 %

Oxo-dicarbonsäure-dimethylester $C_{14}H_{22}O_6$ (XXIX). 55 mg Chrom(VI)-oxid wurde in 0,55 ml trockenes Pyridin eingetragen, eine Stunde geschüttelt, die Lösung von 27 mg Hydroxy-dicarbonsäure-dimethylester (XXVIIIb) in 0,27 ml Pyridin zugefügt und weitere 15 Std. geschüttelt. Nach dem Verdünnen des Reaktionsgemisches mit Wasser wurde mit Aether ausgeschüttelt, der Aetherauszug mehrmals mit 15-proz. Essigsäurelösung und anschliessend mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die 20 mg Rückstand zeigten im Dünnschichtchromatogramm (Methylenchlorid + 3 % Aceton) einen Fleck, Rf 0,47. Zur Analyse wurde das dickflüssige Oel bei 120°/0,01 Torr destilliert. IR.-Absorptionsspektrum (CCl_4): ν_{max} 1743(vs), 1715(s) cm^{-1}. NMR-Spektrum(CCl_4): Figur 11) (Massenspektrum: Figur 12.

$C_{14}H_{22}O_6$ Ber. C 58,73 H 7,75 % Gef. C 58,70 H 7,78 %

***

Die Analysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung des organisch - chemischen Laboratoriums der ETH unter der Leitung von Herrn W. Manser ausgeführt.

Die Absorptionsspektren im UV., Sichtbaren und IR., die elektrometrischen Mikrotitrationen und die thermoelektrischen Molekulargewichtsbestimmungen verdanke ich Herrn P.-D. Dr. W. Simon.

Herrn Dr. J. Seibl danke ich für die Aufnahme und Interpretation der Massenspektren.

Die NMR-Spektren wurden von meinem Kollegen A. Walser aufgenommen, dem ich für seine stetige Hilfsbereitschaft besonders herzlich danke.

ZUSAMMENFASSUNG

Für Rifamycin-B, $C_{39}H_{49}O_{14}N$, einem strukturell neuartigem Stoffwechselprodukt von Streptomyces mediterranei n. sp., sowie dessen Umwandlungsprodukte Rifamycin-O, S und SV wurden die Konstitutionsformeln (I) bis (IV) und die relative Konfiguration an den vier benachbarten Kohlenstoffen C-23 bis C-26 ermittelt.

Durch Methanolyse des Iminomethyläthers (V) aus Rifamycin-S konnte das Kohlenstoffgerüst der Rifamycine in Form von zwei Fragmenten erfasst werden: einer aromatischen Verbindung (VI) und eines Dimethylacetal-methylesters (VII).

Die Konstitution der aromatischen Verbindung (VI) liess sich auf Grund der Ozonolyse von Rifamycin-S, sowie durch Hydrogenolyse eines aus Rifamycin-O erhaltenen Chinondiazids (XV) ermitteln.

Die Konstitution des Dimethylacetal-methylesters (VII) folgt aus den Ergebnissen der Oxydation von Hydrierungsderivaten des Rifamycins-S und aus dem systematischen Abbau bis zum Oxodimethylester (XXIX).

Die Rifamycine und ihre Reaktionsprodukte wurden eingehend spektroskopisch untersucht, wodurch wertvolle Anhaltspunkte gewonnen werden konnten, die zusammen mit den erwähnten chemischen Resultaten schliesslich zu Konstitutionsformeln (I) bis (IV) führten. Demnach enthalten alle Rifamycine die gleiche aliphatische Brücke, die sich über ein aromatisches System spannt; das Rifamycin-B ist somit die erste bisher in der Natur aufgefundene Verbindung vom ansa-Typ.

Auf Grund der abgeleiteten Konstitution lässt sich vermuten, dass die Rifamycine ebenso, wie viele andere mikrobielle Metaboliten, zum grossen Teil aus den biogenetischen Aequivalenten der Essigsäure und Propionsäure aufgebaut sind.

LITERATURVERZEICHNIS

1) P. Sensi, A. M. Greco, R. Ballotta, Antibiotic Annual 1959 - 1960, p. 262.

2) P. Sensi, R. Ballotta, A. M. Greco, Il Farmaco Ed. sc. (1960) 15 228.

3) P. Sensi, R. Ballotta, A. M. Greco, ibid. (1961) 16 165.

4) S. letzte Mitteilung: G. G. Gallo, C. R. Pasqualucci, P. Redaelli, Farmaco, Ed. prat. (1963) 18 78.

5) G. G. Gallo, C. R. Pasqualucci, P. Sensi, Annali di Chimica, (1962) 52 902.

6) O. Dimroth, Ann. (1925) 446 97.

7) Modellverbindungen bei A. Pfiffner, Dissertation ETH, Prom. No. 3361 (1963).

8) L. M. Jackman, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon Press, London 1959.

9) J. M. Birkinshaw, H. Raistrick, D. J. Ross, C. E. Stickings, Biochem. J. (1952) 50 612.

10) A. M. Greco, R. Ballotta, P. Sensi, Il Farmaco Ed. Sc. (1961) 16 766.

11) W. Ried, R. Dietrich, Chem. Ber. (1961) 94 387.

12) R. J. W. Le Fevre, J. B. Sonsa, R. L. Werner, J. chem. Soc. (1954) 4686.

13) L. Birkhofer, Chem. Ber. (1947) 80 83.

14) F. Mylius, ibid. (1885) 18 463.

15) H. Brockman, B. Franck, ibid. (1954) 87 1667.

16) N. Kornblum, R. A. Smiley, R. K. Blackwood, D. C. Iffland, JACS (1955) 77 6269.

17) A. Fredga, B. Oestman, Acta chem. scand. 1956 10 703.

18) K. Biemann, Mass spectrometry, Organic Chemical Applications, Mc Graw-Hill Book Company Inc. 1962.

19) M. S. Barber, A. Hardisson, L. M. Jackman, B. C. L. Weedon, J. chem. Soc. (1961) 1627.

20) NMR Spectra Catalog, N. S. Bhacca, L. F. Johnson, J. N. Shoolery, Instrument Divion of Varian Associates Spectrum No 110, 111.

21) C.H.De Puy, R.W.King, Chem. Rev. (1960) 60 437.
22) L.M.Jackman, R.H.Wiley, J. chem. Soc. (1960) 2887.
23) H.Conroy, Adv. in Org. Chem. (1960) 2 311.
24) J.S.Waugh, R.W.Fessenden, JACS (1957) 79 846.

LEBENSLAUF

Am 4. August 1937 wurde ich in Wien (Oesterreich) geboren. Dort besuchte ich die Volksschule, anschliessend das Privat-Gymnasium Kalksburg und legte 1955 die Reifeprüfung ab.

Im gleichen Jahr begann ich an der philosophischen Fakultät der Universität Wien das Chemiestudium und schloss dieses im Februar 1960 mit dem Doktorandum II ab.

Im März 1960 immatrikulierte ich mich als Fachhörer an der Abteilung für Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Seither arbeitete ich im organisch chemischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. V. Prelog an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Zürich, im September 1963 Wolfgang v. Oppolzer