

wurde erneut in gleicher Weise hydrolysiert und die Behandlung wiederholt, bis alles Ausgangsmaterial umgesetzt war. Das wäbr. Hydrolysat wurde durch eine Aluminiumoxyd-Säule filtriert und die Säule so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat nur noch schwach gelblich gefärbt war. Zur restlosen Entfernung der Zonenbase wurde das Filtrat nochmals durch eine Aluminiumoxydsäule gegeben. Das Filtrat dieser Adsorption machte man mit Natronlauge schwach alkalisch und schüttelte mit Essigester aus. Anschließend wurde mit verd. Salzsäure angesäuert und die Eluatbase mit Chloroform ausgeschüttelt. Die getrocknete Chloroformlösung hinterließ beim Verdampfen das Hydrochlorid der Eluatbase. Aus seiner konz. Lösung in Methanol fiel bei Zusatz von gesätt. Pikrinsäure-Lösung das orangerote Pikrat, das zur Reinigung in Chloroform gelöst und durch Zugabe von Äther als flockiger, orangeroter Niederschlag wieder ausgefällt wurde.

Die Zonenbase wurde aus Actinomycin C (neu) so dargestellt, daß die Hydrolyse mit azeotroper Salzsäure im Wasserbad nach 30 Min. durch Abdestillieren der Salzsäure i. Vak. beendet wurde. Der Rückstand wurde in Butanol aufgenommen und die Lösung an Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Eluatbase konnte durch längeres Nachwaschen mit Butanol völlig entfernt werden. Sodann wurde das Butanol in der Säule durch Äthanol verdrängt, dieses durch Wasser und endlich durch n_{10} NaOH. Das alkal. Eluat wurde schwach angesäuert und mit Butanol-Chloroform (1 : 9) ausgeschüttelt. Nach Verjagen des Lösungsmittelgemisches i. Vak. wurde das zurückgebliebene Zonenbase-Hydrochlorid in gleicher Weise wie das der Eluatbase in das Pikrat übergeführt. Das Pikrat wurde in wenig Methanol gelöst, mit n_{10} HCl versetzt und die Pikrinsäure im Perkolator ausgeäthert. Anschließend wurde die Zonenbase in Butanol-Chloroform (1 : 9) geschüttelt und hinterblieb beim Verdampfen des Lösungsmittels als amorpher, gelbbrauner Rückstand.

39. Hans Brockmann und Willfried Henkel: Pikromycin, ein bitter schmeckendes Antibioticum aus Actinomyceten (Antibiotica aus Actinomyceten, VI. Mitteil.*)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 16. November 1950)

Es wird die Isolierung eines bitter schmeckenden Antibioticums aus einem *Streptomyces*-Stamm beschrieben, für das die Bruttoformel $C_{25}H_{43}O_7N$ ermittelt wurde. Durch Alkali ließ sich daraus ein stickstoff-freies Abbauprodukt $C_{20}H_{30}O_5$ gewinnen.

Wie bereits kurz mitgeteilt, konnten wir aus der Kulturflüssigkeit eines noch nicht näher charakterisierten, in unserem Institut von W. Lindenbein und I. Olfemann isolierten *Streptomyces*-Stammes (Stamm 326) ein kristallisiertes Antibioticum abtrennen, das wir seines bitteren Geschmacks wegen Pikromycin genannt haben¹⁾. Im folgenden berichten wir ausführlicher über Darstellung und Eigenschaften der neuen Verbindung.

Zur Isolierung des Antibioticums wurde der Stamm 326 im Submers-Verfahren mit Glycerin und Glykokoll als Kohlenstoff- bzw. Stickstoff-Quelle kultiviert, wobei die gegen *Staphylococcus aureus* getestete antibiotische Wirksamkeit der Nährlösung nach 6–8 Tagen ihr Optimum erreichte. Äther oder besser Äthyl- bzw. Amylacetat nahm beim Verrühren mit der vom Mycel be-

*) V. Mitteil.: B. s. vorstehende Arbeit, B. 84, 260 [1951].

¹⁾ H. Brockmann u. W. Henkel, Naturwiss. 37, 138 [1950].

freiten²⁾, schwach alkalisch reagierenden Kulturflüssigkeit das Antibioticum zusammen mit vielen Begleitstoffen auf und hinterließ beim Verdampfen einen zähflüssigen, braunen, bis zur Verdünnung 1 : 200000 gegen *St. aureus* wirksamen Rückstand, der als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche diente. Seine Gewinnung ließ sich noch dadurch vereinfachen und im Lösungsmittelverbrauch verbilligen, daß die Kulturflüssigkeit zunächst i. Vak. auf den fünfzigsten Teil ihres Volumens eingeengt und dann erst mit Amylacetat oder Äther extrahiert wurde.

Versuche, auf chromatographischem Wege eine Anreicherung des Ausgangsmaterials zu erzielen, verliefen unbefriedigend. Bei der Adsorption aus Benzol an Aluminiumoxyd bildeten sich mehrere Zonen aus, auf die das Antibioticum zwar ungleichmäßig, aber doch zu wenig unterschiedlich verteilt war, um eine nennenswerte Konzentrierung zu erreichen.

Geeigneter erwies sich eine Verteilung des Ausgangsmaterials zwischen 90-proz. Methanol und Petroläther, bei der das Antibioticum zusammen mit blaß gelb gefärbten Begleitstoffen das Methanol aufsuchte, während braune, schmierige Beimengungen im Petroläther blieben. Die Wirksamkeit der Methanol-Fraktion war etwa doppelt so groß, wie die des Ausgangsmaterials. Bemühungen, durch Behandeln des Methanolextrakt-Rückstandes mit verschiedenen Lösungsmitteln eine weitere Fraktionierung zu erreichen, hatten keinen Erfolg. Dagegen war die chromatographische Adsorption des durch Verteilung vorgereinigten Materials wirkungsvoller als beim braunen Ausgangsprodukt. Die beste hierbei erhaltene Fraktion, ein farbloses Pulver, war gegen *St. aureus* bis 1 : 1000000 wirksam. Bei seiner erneuten Adsorption — diesmal an fluoreszierendem Leuchtfarben-Aluminiumoxyd³⁾ — bildete sich eine im kurzwelligen UV-Licht gut erkennbare Zone, die auch bei längerem Nachwaschen einheitlich blieb, ein Zeichen, daß bereits ein einigermaßen reines Produkt vorlag.

In diesem Stadium der Arbeit fiel uns der bittere Geschmack der Fraktionen auf. In der, wie sich später herausstellte, richtigen Annahme, daß der bittere Geschmack dem Antibioticum zuzuschreiben sei, wurde die Geschmacksprobe mit zur Kontrolle der Anreicherung herangezogen.

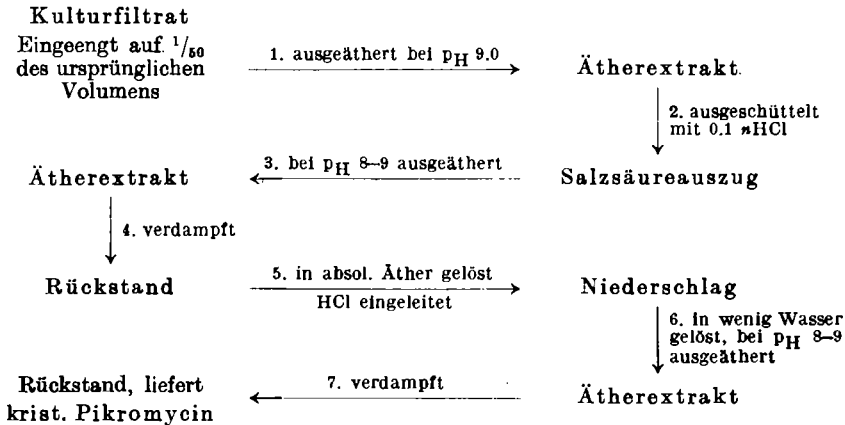
Eine wesentliche Vereinfachung des Anreicherungsverfahrens brachte die Erkenntnis, daß sich Pikromycin auf Grund seines basischen Charakters aus organischen Lösungsmitteln in verd. Säure überführen und dadurch von der Hauptmenge der Begleitstoffe abtrennen läßt. Zur Aufarbeitung des Ausgangsmaterials wurde nunmehr dessen braune Ätherlösung mit verd. Salzsäure ausgeschüttelt und die wäßrige Phase nach Einstellen auf pH 8–9 wiederum mit Äther extrahiert. Beim Verdampfen des Äthers hinterblieb ein farbloser, lackartiger Rückstand, der zum größten Teil aus Pikromycin bestand. Zur weiteren Reinigung wurde in die konz. Ätherlösung dieses Rückstandes trockener Chlorwasserstoff eingeleitet, wobei das Hydrochlorid des

²⁾ Das Mycel enthielt nur wenig Antibioticum; auf seine Aufarbeitung wurde daher verzichtet.

³⁾ H. Brockmann u. F. Volpers, B. 82, 95 [1949]; H. Brockmann u. E. Beyer, Angew. Chem., im Druck.

Antibioticums als flockiger, in Wasser spielend löslicher Niederschlag ausfiel. Aus der konz. wäßrigen Lösung des Hydrochlorides schied sich bei schwach alkalischer Reaktion das Antibioticum amorph aus. Langsames Eindunsten einer wäßrigen Lösung dieser Fraktion lieferte die ersten, charakteristischen Kristalle des Pikromycins, die als Impfmateriel verwendet, nun leicht die Gewinnung größerer Mengen kristallisierten Materials ermöglichten. Das folgende Schema gibt den Gang der Anreicherung wieder:

Schema der Pikromycin-Gewinnung



Im weiteren Verlauf der Untersuchung stellte sich heraus, daß man in den meisten Fällen auf die Reinigung über das Hydrochlorid verzichten und bereits den Äther-Rückstand vom Arbeitsgang 3 (vergl. das vorstehende Schema) zur Kristallisation bringen kann.

Pikromycin kristallisiert aus Methanol in sargdeckelähnlichen, farblosen Kristallen vom Schmp. 169–170° und $[\alpha]_D^{24}$: -50.2° (Chloroform), $[\alpha]_D^{24}$: $+8.2^\circ$ (Alkohol). Die Grenze der antibiotischen Wirksamkeit gegen *St. aureus* liegt bei der Verdünnung 1 : 2000000, die *dosis letalis minima* bei intravenöser Verabreichung zwischen 0.1 und 0.7 g/kg Maus.

In Wasser ist das Antibioticum wenig, in verd. Säuren ist es ebenso wie in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich. Charakteristische Absorptionsbanden im UV fehlen. Die orangerote Lösung in konz. Schwefelsäure zeigt ebenfalls nur Endabsorption. Pikrin- und Pikrolonsäure fallen aus der wäßrigen Lösung ein amorphes Pikrat bzw. Pikrolonat.

Aus unseren Analysen und Mol-Gew.-Bestimmungen ergibt sich für Pikromycin die Bruttoformel $C_{25}H_{43}O_7N$. Nach Untersuchungen von H. Genth⁴⁾ liegt der Stickstoff in Form einer Dimethylamino-Gruppe vor. Über die Funktion der Sauerstoff-Atome können wir noch keine Angaben machen; Methoxy-Gruppen sind nicht vorhanden, und auch für das Vorliegen von Keto- oder Aldehyd-Gruppen haben sich bisher keinerlei Anhaltspunkte gefunden.

⁴⁾ Dissertat. Göttingen, 1951.

Pikromycin bleibt bei 3stdg. Erhitzen auf 125° i. Vak. völlig unverändert. Kurzes Erwärmen mit verd. Säure oder Lauge führt zum Verlust der antibiotischen Wirksamkeit. Die beim Kochen mit Salzsäure erhaltenen Abbauprodukte zeigen keine Ninhydrin-Reaktion.

Durch milde Alkali-Einwirkung konnten wir aus Pikromycin ein kristallisiertes, stickstoff-freies Abbauprodukt gewinnen, dem auf Grund der Analysen und Mol.-Gew.-Bestimmungen die Bruttoformel $C_{20}H_{30}O_5$ zukommt. Es ist antibiotisch unwirksam, in Säuren und Laugen wenig löslich und zeigt keinen bitteren Geschmack. Dieses für die Konstitutionsermittlung des Antibioticums wichtige Spaltprodukt scheidet sich in geringer Ausbeute aus, wenn die auf pH 8 eingestellte Lösung des Pikromycin-hydrochlorides 12–14 Stdn. bei 60° gehalten wird. Die Gewinnung des Abbauproduktes ließ sich bisher nicht in allen Ansätzen reproduzieren. Die Ursache dafür konnte noch nicht ermittelt werden.

Aus einem zweiten *Streptomyces*-Stamm, der mit Stamm 326 nicht identisch ist, konnten K. Bauer und B. Benfey⁵⁾ in unserem Institut ebenfalls Pikromycin isolieren. Die Menge des gebildeten Antibioticums war hier größer, seine Isolierung durch schwer abtrennbare Begleitstoffe aber schwieriger.

Kürzlich ist von R. Q. Marston⁶⁾ die Abtrennung von drei Antibioticis aus der Kulturflüssigkeit von *Proactinomyces gardneri* beschrieben worden, die als Proactinomycin A, B und C bezeichnet sind. Proactinomycin A konnte kristallisiert erhalten werden und zeigt in seinen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit unserem Pikromycin. Leider sind von Marston über den Geschmack und die spezif. Drehung seines Präparates keine Angaben gemacht, so daß die Frage, in welcher Beziehung Pikromycin zum Proactinomycin A steht, vorläufig offen bleiben muß.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft und insbesondere den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, danken wir für weitgehende Unterstützung unserer Arbeiten. Die Durchführung der größeren Submersansätze verdanken wir Hrn. Dr. Bohne, Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer.

Beschreibung der Versuche

Kultur des Stammes 326

Stammkultur: Die Stammkultur wurde bei 20° in Schräg-Agar-Röhrchen gehalten. Nährboden war die unten angegebene, durch Zusatz von 3% Agar gelierte Kulturlösung.

Vorkultur: Je 50 ccm der unten angegebenen Nährlösung wurden in 300 ccm-Erlenmeyer-Kolben sterilisiert und mit Impfmateriale aus der Stammkultur versetzt. Die Kolben schüttelte man 5 Tage bei 30°, wobei sich das Mycel vermehrte. Die Lösung hemmte nach Ablauf dieser Zeit das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100.

Hauptansatz⁷⁾: Die verwendete Kulturlösung enthielt in 500 l Leitungswasser: 10 kg Glycerin, 0,75 kg Glykokoll, 1 kg Maisquellwasser, 0,75 kg K_2HPO_4 , 0,5 kg NaCl, 25 g $MgSO_4$, 5 g $FeSO_4$ und 5 g $CaCO_3$.

Die Nährlösung wurde in einem mit Rühr- und Belüftungsvorrichtung versehenem 1000 l-Kessel 1 Stde. bei 120° sterilisiert. Nach Abkühlen auf 30° impfte man unter

⁵⁾ B. Benfey, Diplomarbeit, Göttingen 1950.

⁶⁾ Brit. Journ. Experim. Pathol. 1950, 398.

⁷⁾ Durchgeführt von Dr. Bohne, Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer.

sterilen Bedingungen mit etwa 1 l der vorstehend beschriebenen Vorkultur und bebrütete unter Rühren und Belüften 6–8 Tage bei 30°.

Das p_H der Nährlösung betrug anfangs 6.8–7.2 und stieg während der Bebrütung auf 7.4–8.1 an. Die schon vor dem Beimpfen schwach braun gefärbte Nährlösung änderte ihre Farbe beim Wachstum der eingepfimpften Mikroorganismen nicht.

Nachdem das Mycel (Trockengewicht etwa 2 kg) abzentrifugiert war, wurde die Kulturflüssigkeit i. Vak. auf 8 l eingengt und zweimal mit dem gleichen Vol. Äther durchgeschüttelt. Statt die Kulturlösung einzudampfen, kann man sie auch direkt mit Äthyl- oder Amylacetat extrahieren und den beim Verdampfen dieser Lösungsmittel hinterbleibenden Rückstand als Ausgangsmaterial verwenden.

Isolierung des Pikromycins

Das eingengte Kulturfiltrat oder der mit Wasser aufgenommene Verdampfungsrückstand des Äthylacetat- bzw. Amylacetat-Extraktes der Kulturflüssigkeit wird auf p_H 9.0 eingestellt und mit dem doppelten Vol. Äther ausgerührt. Der Ätherauszug wird auf ein bequem zu handhabendes Volumen (0.5–1 l) eingengt und mit dem Dreifachen der zur Neutralisation des basischen Antibioticums erforderlichen Menge 0.1 n HCl ausgeschüttelt, wobei das Antibioticum in die wäbr. Phase geht, die nach dem Ausschütteln p_H 1–2 zeigen soll. Im Äther bleibt die Hauptmenge der farbigen Begleitstoffe zurück. Um noch im Äther enthaltenes Antibioticum zu gewinnen, wäscht man diesen zweimal mit wenig Wasser und vereinigt das Waschwasser mit der sauren, wäbr. Lösung des Antibioticums. In diese Lösung wird unter Rühren und laufender Kontrollé des p_H -Wertes zunächst, um die Hauptmenge der Säure zu neutralisieren, starke Natriumcarbonat-Lösung eingetropt. Dann stellt man durch Zugabe von 2 n Na_2CO_3 auf p_H 9–10 ein, wobei eine milchige Trübung bzw. eine käsige Fällung auftritt. Die nun erfolgende erschöpfende Extraktion mit Äther kann durch Aussalzen der kolloidalen, wäbr. Lösung erheblich beschleunigt werden. Die völlig alkalifrei gewaschene Ätherlösung wird – zuletzt i. Vak. – zur Trockne verdampft, wobei bisweilen schon spontane Kristallisation eintritt. Zur Reinigung wird aus siedendem Methanol oder Äthanol umkristallisiert und mit eiskaltem Methanol nachgewaschen. Falls die Kristallisation nicht gelingt, wird der Äther-Rückstand, wie im theoretischen Teil beschrieben, über das Hydrochlorid gereinigt und zur Gewinnung von Impf-Kristallen eine wäbr. Lösung des amorphen Antibioticums langsam eingedunstet.

Pikromycin ist in Wasser, Petroläther und Schwefelkohlenstoff schwer löslich, leicht dagegen in Aceton, Benzol, Chloroform, Essigester und Dioxan. 100 ccm Äthanol nehmen bei 20° 3.5 g Antibioticum auf. Die Lösung in Eisessig entfärbt eine wäbr. Kaliumpermanganatlösung rasch, mit Brom-Eisessig dagegen reagiert sie nicht merklich. Mit *p*-Nitrophenylhydrazin sowie mit Semicarbazid reagiert Pikromycin weder bei mehrstündigem Erwärmen, noch bei mehrtägigem Aufbewahren bei 20°. Bei der Zinkstaubdestillation des Antibioticums geht ein leicht flüchtiges, gegen Lackmus und Kurkuma stark alkalisch reagierendes Öl über, dessen Geruch demjenigen aliphatischer Amine ähnelt.

$C_{25}H_{43}O_7N$ (469.6) Ber. C 63.94 H 9.23 N 2.98
Gef. C 63.86⁸⁾ H 9.02 N 2.92 Mol.-Gew. 458⁹⁾

Alkali-Abbau des Pikromycins

Eine Lösung von 80 mg Pikromycin-hydrochlorid in 25 ccm Wasser wird mit 2 n NaOH auf p_H 8.0 eingestellt und 10 Stdn. bei 60° aufbewahrt. Dabei scheiden sich häufig gut ausgebildete, farblose Kristalle ab, die denen des Pikromycins sehr ähnlich sind. Nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser liegt der Schmp. bei 172°. In konz. Schwefelsäure löst sich das Abbauprodukt orangegeb.

$C_{20}H_{30}O_5$ (350.4) Ber. C 68.55 H 8.63 Gef. C 68.74 H 8.77 Mol.-Gew. 330⁹⁾

⁸⁾ Mittelwert aus 6 Analysen von dreimal umkristallisierten Präparaten.

⁹⁾ Nach Rast in Campher bestimmt.