

Bestimmung von Ammoniak und Kohlendioxyd bei der Bildung des Desamino-actinomycins C: In einem Zweihalskolben wurde eine Lösung von 250.6 mg Actinomycin C in 80 ccm kohlenstofffreier 10-proz. Salzsäure unter Durchleiten eines Stickstoffstromes 4 Stdn. auf 60° erwärmt. Der Stickstoffstrom wurde durch einen Rückflußkühler und dann durch eine Waschflasche mit 20 ccm 5*n* NaOH geleitet. Anschließend wurde die Natronlauge zur Bestimmung¹⁸⁾ des bei der Reaktion möglicherweise gebildeten Kohlendioxyds mit einer Lösung von 8.5 g Bariumchlorid und 6 g Ammoniumchlorid in 25 ccm Wasser versetzt. Es trat keine Fällung ein.

Die salzsaure Lösung wurde mit Chloroform extrahiert und eingedampft. Das im Rückstand enthaltene Ammoniak wurde in einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur bestimmt. Gef. NH₃ 3.12 mg (0.93 Mol, bez. auf Mol.-Gew. 1300).

Saure Hydrolyse des Desamino-actinomycins C₂: Eine Lösung von 313 mg Desamino-actinomycin C₂ in 120 ccm 10-proz. Salzsäure wurde solange auf 80° erwärmt, bis (nach etwa 15 Stdn.) das Ausgangsmaterial vollständig in ein weiteres Abbauprodukt von kleinerem R_F-Wert umgewandelt war. Um diesen Zeitpunkt zu erkennen, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben des Hydrolysats entnommen, in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und die Rückstände des Chloroformauszugs im Ringpapierchromatogramm untersucht. Das rotgefärbte Hydrolysat schüttelte man mit Butanol durch, wusch die Auszüge mit Wasser, trocknete mit Natriumsulfat und verdampfte i. Vakuum. Der rotbraune, amorphe Rückstand war leicht löslich in Wasser und Methanol und schwer löslich in Benzol und Chloroform.

Die mit Butanol ausgeschüttelte, saure wäßr. Lösung wurde i. Vak. eingedampft. Im Rückstand wurden die Aminosäuren Sarkosin, Threonin, Prolin, Valin, *N*-Methyl-valin und Allo-isoleucin papierchromatographisch nachgewiesen.

Untersuchung der Zinn(II)-chlorid-Reaktion beim milden Säureabbau des Actinomycins C: Eine Lösung von 60.2 mg Actinomycin C in 100 ccm 10-proz. Salzsäure wurde auf 60° erwärmt. Man entnahm der Lösung in wachsenden Zeitabständen Proben von je 5 ccm, die mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und im Lange-Kolorimeter mit soviel 0.01*n* Zinn(II)-chlorid versetzt wurden, wie notwendig war, um das Maximum der Grünfärbung zu erreichen. Die Grünfärbung konnte durch Verwendung der Rotfilter RG2 selektiv erfaßt werden.

280. Hans Brockmann und Hans Musso: Geomycin, II. Mitteil.*); Antibiotica aus Actinomyceten. XXIX. Mitteil.**)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]
(Eingegangen am 20. September 1954)

Aus Mycel und Kulturlösung von *Streptomyces xanthophaeus* (nov. spec.) wurde ein neues, gegen grampositive und -negative Bakterien wirksames, wasserlösliches Antibioticum, das Geomycin, als kristallisiertes Salz der 4'-Dimethylamino-azobenzol-sulfonsäure-(4)***) isoliert. Geomycin besteht wie Neomycin, Streptothricin und andere basische Antibiotica aus mehreren, einander sehr ähnlichen Komponenten (Geomycin A, B, C und D), die sich papierchromatographisch trennen lassen. Die Geomycine sind mehrsaurige Basen, für die als vorläufige Bruttoformel (C₈H₁₂O₂N₂)₈₋₁₀ angenommen wird.

Unter den vielen, in unserem Institut isolierten Actinomyceten-Stämmen fanden wir mehrere, die wegen ihrer Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien von Interesse sind. Vorversuche zeigten, daß es sich bei den Anti-

¹⁸⁾ H. E. Charter, R. K. Clark, P. Kohn, J. W. Rothrock, W. R. Taylor, C. A. West, G. B. Whitfield u. W. G. Jackson, J. Amer. chem. Soc. **76**, 566 [1954].

*) I. Mitteil.: H. Brockmann u. H. Musso, Naturwissenschaften **41**, 451 [1954].

***) XXVIII. Mitteil.: H. Brockmann u. H. Musso, Naturwissenschaften **41**, 451 [1954].

****) Im folgenden kurz als Helianthinsalz bezeichnet.

biotieis dieser Stämme um wasserlösliche Basen handelt, die sich mit organischen Lösungsmitteln nicht ausschütteln lassen, an Aktivkohle adsorbiert werden und nur mit saurem Methanol eluierbar sind. Sie gehören demnach in die Gruppe CI der von S. A. Waksman aufgestellten Systematik der Antibiotica¹⁾. Da von dieser Gruppe außer den Streptomycinen, Neomycinen und Streptothricinen eine Anzahl weiterer Vertreter bekannt ist, haben wir zunächst untersucht, ob unsere Antibiotica mit bereits beschriebenen identisch sind. Dafür brauchten wir ein Verfahren, mit dem sich aus 10–20-l-Kulturansätzen unserer Stämme ein für den Vergleich mit anderen Vertretern der CI-Gruppe genügend angereichertes Rohantibioticum gewinnen läßt. Seine Ausarbeitung wird in Abschnitt I beschrieben. Die Untersuchung der mit diesem Verfahren hergestellten Konzentrate (Abschnitt II) hat gezeigt, daß unsere Stämme mehrere, einander sehr ähnliche antibiotisch wirksame Verbindungen bilden, die mit keinem bisher bekannten Antibioticum identisch sind. Wir bezeichnen diesen neuen Antibiotica-Komplex als Geomycin und unterscheiden die einzelnen Vertreter durch die Buchstaben A, B usw.

I. Abtrennung und Anreicherung der Antibiotica mit Ionen-Austauschern

Näher untersucht wurden zunächst die gegen *E. coli* wirksamen Stämme Wüst 70, Geiss 786 und Ital 1142. Wüst 70 gehört nach W. Lindenbein²⁾ einer neuen, *Streptomyces xanthophaeus* genannten Art an, der wahrscheinlich auch Geiss 786 und Ital 1142 zuzuordnen sind. Alle drei wurden zunächst im Oberflächenverfahren mit Glycerin und Natriumnitrat als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle kultiviert.

Die Aufarbeitung der Kulturlösung mit Aktivkohle führte zu sehr unreinen Rohprodukten, die nur etwa 20 % der ursprünglich vorhandenen aktiven Substanz enthielten. Daher wurde versucht, die Aktivkohle durch Ionen-Austauscher zu ersetzen, die sich bereits bei der Abtrennung anderer basischer Antibiotica bewährt haben³⁾.

Bei ihrer Auswahl war folgendes zu berücksichtigen:

Basen werden von den stark sauren Kationen-Austauschern ($-\text{SO}_3\text{H}$) leicht aufgenommen. Ihre quantitative Elution gelingt jedoch nur mit starken Basen oder Säuren oder konz. Salzlösungen, unter Bedingungen also, die wir wegen der Säure- und Alkaliempfindlichkeit unserer Antibiotica vermeiden mußten bzw. wegen der lästigen Salzmengen nicht in Frage kamen. Außerdem kann, falls die H-Form des Austauschers angewandt wird, schon durch dessen Säurewirkung das Antibioticum geschädigt werden. Diese Schwierigkeiten entfallen bei den schwach sauren Austauschern ($-\text{COOH}$). Auch wenn sie in der Salzform vorliegen, nehmen sie die großen, oft mehrfach geladenen Kationen der basischen Antibiotica leicht auf und geben sie beim Eluieren mit schwachen Säuren oder sehr verdünnten Lösungen starker Säuren ebenso leicht und quantitativ wieder ab. Erfolgt der Ionenaustausch bei bestimmtem p_{H} , so kann, sofern sich die Kationen der Lösung in Ladung, p_{K} -Wert oder Größe und Gestalt unterscheiden, der Austausch fraktio-

¹⁾ S. A. Waksman, J. of the History of Medicine and Allied Sciences **3**, 318 [1951].

²⁾ Arch. Mikrobiol. **17**, 361 [1952].

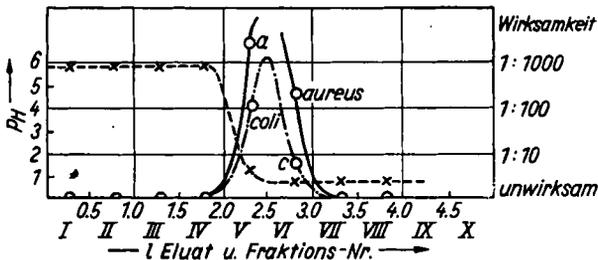
³⁾ Vergl. z. B. E. O. Karow, R. L. Peck, C. Rosenblum u. D. T. Woodbury, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3056 [1953].

nierend durchgeführt werden. Deshalb verwendeten wir den schwach sauren Austauscher Amberlite IRC-50, über dessen Quellung, Gesamt- und Durchlaufkapazität der Versuchs- teil Angaben bringt. Der Austauscher ist weiß, so daß sich die Adsorption gefärbter Substanzen leicht erkennen läßt.

Um zunächst in Vorversuchen geeignete Bedingungen für die Adsorption und Elution unserer Antibiotica zu ermitteln, filtrierten wir je 10 ccm der auf p_H 8.5–9.0 eingestellten Kulturlösungen unserer Stämme durch kleine Säulen, die den Austauscher in drei verschiedenen Zubereitungen enthielten: 1. als reine H-Form, 2. mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung bis zu 92 % ins Natriumsalz übergeführt und 3. mit Phosphatpuffer (p_H 6.5) zu 45 % mit Natriumionen belegt. Als Vergleichssubstanzen dienten Streptomycin und Neomycin. In allen Fällen wurde das Antibioticum vollständig in der Säule zurückgehalten und konnte ohne Verluste mit 0.5 n HCl wieder eluiert werden.

Die Verwendung von gepuffertem Austauscher hat den Vorteil, daß die braunen Stoffwechselprodukte der Kulturlösung im Gegensatz zum Antibioticum nicht adsorbiert werden, sondern ins Filtrat laufen. Sie lassen sich so in einfacher Weise entfernen, während früher ihre Abtrennung nur mit Aktivkohle gelang und mit großen Verlusten an Antibioticum verbunden war. Von der H-Form des Austauschers dagegen werden die braunen Begleitstoffe zusammen mit dem Antibioticum festgehalten und beim Eluieren mit Säuren nur zum Teil wieder abgegeben.

Auch beim Arbeiten im präparativen Maßstab haben sich die Austauscher bewährt. Abbild. 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer Säule aus 300 g gepuffertem (p_H 6.5) Amberlite IRC-50, durch die 37 l Kulturflüssigkeit vom



Abbild. 1. Elutionsdiagramm des Antibioticums aus Stamm Geiß 786

Stamm Geiss 786 filtriert waren. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und anschließend mit 0.5 n HCl eluiert, wobei das Filtrat, sobald Chlor-Ionen darin nachzuweisen waren, fraktioniert aufgefangen wurde. Der Durchbruch der Säure erfolgte gleichzeitig mit dem des Antibioticums.

Zu Beginn der Elution bildete sich am oberen Säulenende eine unscharfe, hellgraue Zone, die langsam abwärts wanderte und gleichzeitig mit dem Antibioticum ins Filtrat ging. Die in dieser Zone in relativ kleiner Menge enthaltenen Begleitstoffe sind also ein Indikator für die Zone des Antibioticums.

Die Fraktionen wurden sofort mit der OH-Form des schwach basischen Amberlites IR-4-B neutralisiert. Dadurch vermeidet man die Neubildung von Salzen, die im weiteren Verlauf der Reinigung wieder entfernt werden müssen und verhindert das Auftreten eines zeitweiligen Alkaliüberschusses.

Beim Eindampfen der neutralisierten Fraktionen V und VI hinterblieb ein Salzkuchen, dessen Methanolauszug nach dem Einengen einen hellbraunen, hygroskopischen Lack (3.7 g) hinterließ, der im Verdünnungstest gegen *St. aureus* bis $1:7.5 \times 10^5$ und gegen *E. coli* bis $1:5 \times 10^4$ wirksam war. Dieses Konzentrat enthält, wie sich später durch Vergleich mit reinsten Produkten ergab, etwa 20 bis 25 % Antibioticum (Rest Natriumchlorid und Calciumchlorid), was etwa 75 % des in der Kulturlösung vorhandenen Antibioticums entspricht. Konzentrate von mindestens gleicher Wirksamkeit erhielten wir nach dem gleichen Verfahren aus der Kulturlösung der Stämme Wüst 70 und Ital 1142.

II. Charakterisierung der Antibiotica aus den Stämmen Wüst 70, Geiss 786 und Ital 1142

Um zu entscheiden, ob die Antibiotica unserer drei Stämme mit bereits bekannten Vertretern der Gruppe C I identisch sind, haben wir die mit Austauschern gewonnenen Konzentrate auf drei verschiedene Weisen charakterisiert: 1. durch Farbreaktionen, 2. durch ihr papierchromatographisches Verhalten und 3. durch die Papierchromatogramme ihrer Hydrolysate. Tafel I zeigt die Farbreaktionen unserer Antibiotica in Vergleich mit Neomycin und Streptomycin.

Tafel I. Farbreaktionen der Antibiotica^{a)}

	Wüst 70	Geiss 786	Ital 1142	Str. ^{b)}	Neo. ^{c)}
Ninhydrin	+	+	+	-	+
Biuret ^{d)}	-	-	-	-	-
Sakaguchi	+ ^{e)}	+ ^{e)}	+ ^{e)}	+	-
Maltol ^{d)}	-	-	-	+	-
Eisen(III)-chlorid	-	-	-	-	-
Elson-Morgan	+	+	+	+	-
Eisen(III)-cyanid-Nitrosylprussiat ^{d)}	viol.	viol.	viol.	rot	-
2.4-Dinitro-phenylhydrazin	-	-	-	-	-

a) Außerdem zeigen alle Verbindungen mehr oder weniger schwache und verzögerte Reaktionen auf Zucker und Kohlenhydrate, z. B. Anthron-, Carbazol-, Tollens-, Molisch-, Fehlingsche Reaktion.

b) Streptomycin von Farbenfabriken Bayer-Leverkusen.

c) Neomycin von Heyden, Chemical Corp., New York.

d) Wir sehen die Biuretreaktion als positiv an, wenn die für Polypeptide charakteristische intensive rotviolette Färbung auftritt. Bei allen oben aufgeführten Verbindungen war die Lösung hellblau.

e) deutlich schwächer als beim Streptomycin.

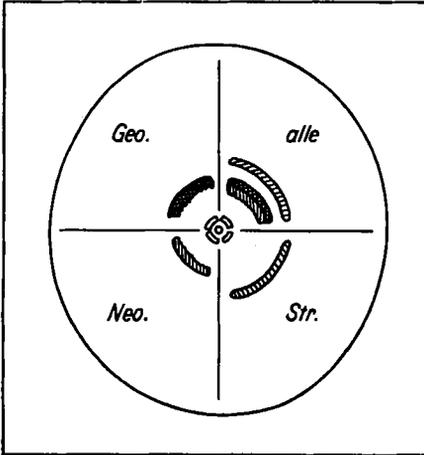
Streptomycin, Streptothricin und Neomycin lassen sich papierchromatographisch im System Butanol-2-proz. wäBr. *p*-Toluolsulfonsäure (mit oder ohne Zusatz von 2 % Piperidin) trennen^{e)}. Da die R_F -Werte hier sehr

⁴⁾ I. R. Schenck u. M. A. Spielmann, J. Amer. chem. Soc. 67, 2276 [1945]; UV-Spektrum der Maltolreaktionslösung siehe Abbild. 7.

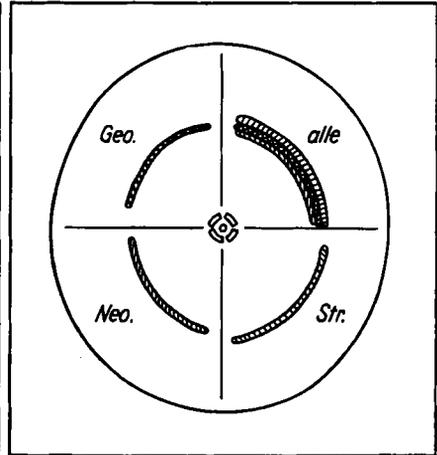
⁵⁾ R. E. Horne u. A. L. Pollard, J. Bacteriol. 55, 231 [1948].

⁶⁾ W. A. Winsten u. E. Eigen, J. Amer. chem. Soc. 70, 3333 [1948]; D. H. Peterson u. L. M. Reineke, ebenda 72, 3598 [1950].

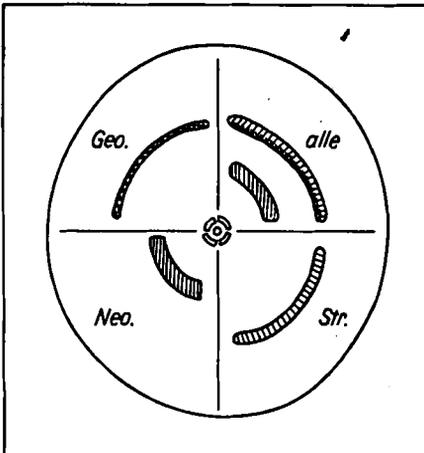
klein sind, gelingt die Trennung erst nach langen Laufzeiten, bei denen die Zonen unscharf werden. Deshalb suchten wir nach neuen Lösungsmittelsystemen und fanden unter 55 verschiedenen Gemischen mehrere, die sich im Ringchromatogramm, wie Abbild. 2 zeigt, für unsere Zwecke eignen. Die



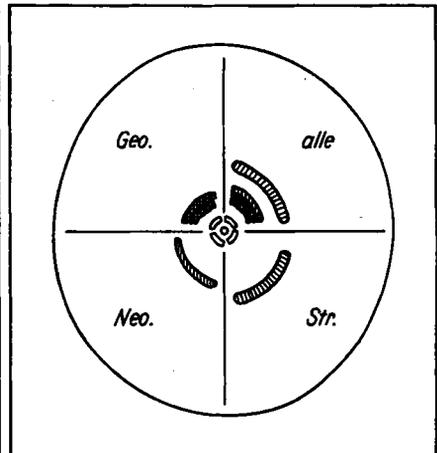
Butanol-Ameisens.-Wasser 2:1:1
4.75 Std.



Butanol-Ameisens.-Wasser 3:3:2
5.75 Std.



Butanol-Eisessig-Wasser 1:2:1
7.3 Std.



Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser
15:10:3:12, 4.3 Std.

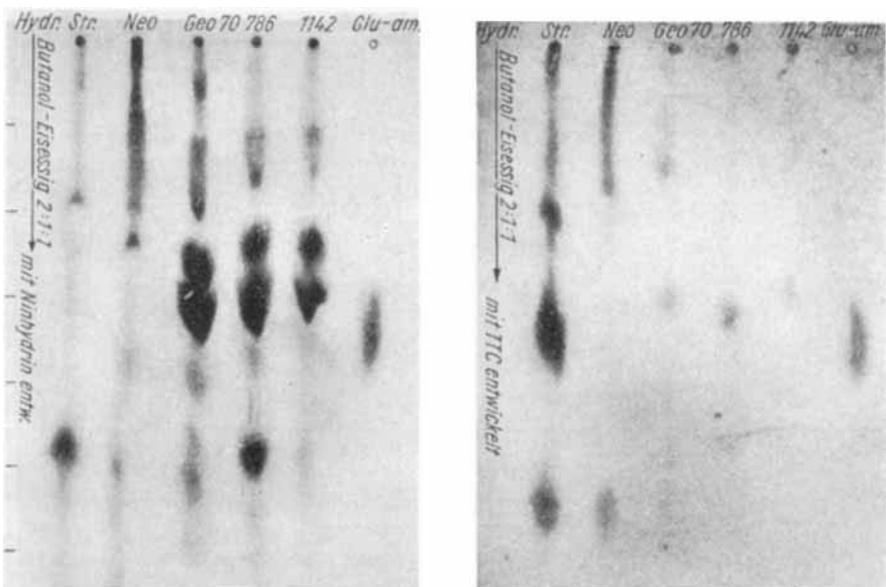
Abbild. 2. Papierchromatogramme der Antibiotica in verschiedenen Lösungsmittelsystemen

Diese und die folgenden Chromatogramme wurden auf Schleicher & Schüll Papier Nr. 2043 b gemacht.

Zonen unserer Antibiotica und die des Neomycins wurden mit Ninhydrin sichtbar gemacht, die des Streptomycins mit dem Reagens aus Kaliumeisen(III)-cyanid und Natrium-nitrosyl-prussiat⁵⁾. Durch mikrobiologischen Test der Papierchromatogramme überzeugten wir uns davon, daß die Farbzonen mit denen der Antibiotica übereinstimmen.

In Butanol-Eisessig-Wasser (1:2:1) ist das am langsamsten wandernde Neomycin deutlich von Streptomycin und unserem Antibioticum aus Stamm Wüst 70 getrennt. Umgekehrt liegt in Butanol-Ameisensäure-Wasser (2:1:1) unser Antibioticum dicht neben Neomycin, während Streptomycin schneller wandert. Eine Trennung der drei Antibiotica in drei in der Reihenfolge Neomycin-Antibioticum Wüst 70-Streptomycin (von innen nach außen) dicht hintereinander liegende scharfe Zonen gelang in Butanol-Ameisensäure-Wasser (3:3:2). Eine gute Trennwirkung zeigte ferner Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (15:10:3:12) (Abbild. 2a–d), in dem Streptomycin am schnellsten und unser Antibioticum am langsamsten wanderte. In diesem System wurde unser Antibioticum in zwei, beim Einsatz größerer Mengen sogar in drei Zonen getrennt. Wahrscheinlich lassen sich die vier Lösungsmittel-Systeme auch zur Trennung von anderen Vertretern der Gruppe CI anwenden. Leider standen uns für einen solchen Vergleich Proben anderer Antibiotica nicht zur Verfügung.

Um unsere Antibiotica durch das Papierchromatogramm ihrer Hydrolysate zu charakterisieren, haben wir Proben mit 6*N*HCl gekocht und das Hydrolysat von Zeit zu Zeit papierchromatographisch im System Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) untersucht. Abbild. 3 zeigt zum Vergleich das nach 9 Stdn. erhaltene Hydrolysat von Neomycin, Geiss 786, Wüst 70, Ital 1142 und Streptomycin⁷⁾.



Abbild. 3. Papierchromatographischer Vergleich der hydrolysierten Antibiotica. Links mit Ninhydrin, rechts mit Triphenyl-tetrazoliumchlorid entwickelt. Glu-am = Glucosamin

⁷⁾ Streptomycin wurde nur 2 Stdn. hydrolysiert, weil bei längerem Erhitzen keine neuen Hydrolyseprodukte mehr auftreten, und die Melaninbildung stark zunimmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich unsere Antibiotica durch ihre Farbreaktionen, ihr Papierchromatogramm und insbesondere das Papierchromatogramm ihres Hydrolysates eindeutig von den bisher bekannten Vertretern der Gruppe CI unterscheiden. Untereinander zeigen sie dagegen keine nennenswerten Unterschiede. Demnach sind sie entweder identisch oder einander sehr ähnlich.

III. Isolierung des Geomycins

Als Ausgangsmaterial erhielten wir von Dr. A. Bohne, Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer A. G., dem wir unseren Stamm überlassen hatten, Kohleabsorbate aus 500-l-Submersansätzen, die teilweise bereits durch Elution mit sauren Lösungsmitteln in ein amorphes, stark wirksames Geomycinsulfat übergeführt worden waren ^{7a)}. Nach dem Eluieren dieser Absorbate mit schwefelsaurem Aceton-Wasser (3:2) bei p_H 2, Neutralisation mit Bariumhydroxyd und Einengen i. Vak. wurde ein noch stark verunreinigtes, dunkelbraunes Sulfat erhalten (*St. aureus* 1:1 × 10⁵, *E. coli* 1:1 × 10⁴). Die Reinigung über das schwer lösliche Pikrat führte zu einem braunen, sehr hygroskopischen Hydrochlorid (*St. aureus* 1:5 × 10⁵, *E. coli* 1:5 × 10⁴). Die Ausbeute an wirksamer Substanz betrug etwa 20 %. Durch fraktionierte Ad- und Desorption an Aktivkohle und nochmalige Pikratfällung konnte das Hydrochlorid als farbloses, hygroskopisches Pulver erhalten werden. $[\alpha]_D^{20}$: +8.9° ($c = 2.8$ in Wasser) das gegen *St. aureus* 1:1 × 10⁶ und *E. coli* 1:1.6 × 10⁵ antibiotisch wirksam war. Die ersten Stufen der Aufarbeitung und Reinigung wurden von F. Kluge in unserem Institut ausgeführt.

Tafel 2. Schwerlösliche Salze des Geomycins

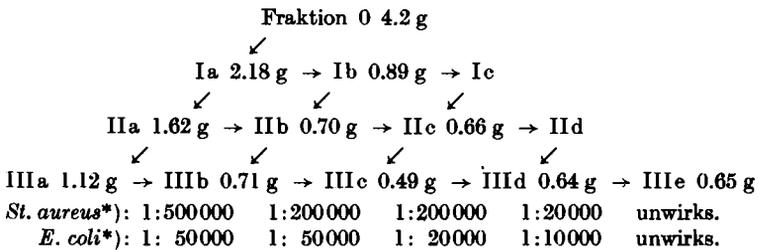
Reagens	Eigenschaften des Niederschlages
Pikrinsäure	orange-gelb, ölig
Pikrolonsäure	gelb, amorph
Flaviansäure	gelb, ölig
Hexachloro-palladium(IV)-säure	gelb, ölig
Gold(III)-chlorid	gelb, ölig
4-Oxy-azobenzol-sulfonsäure-(4')	orange, schmierig, amorph
Helianthin	dkl. rot, klebrig, amorph
β-Naphtholorange	rot, ölig
Phosphorwolframsäure	schmutzig weiß, amorph
Reinecke-Salz	rosa, amorph
Naphtholblauschwarz	schwarz, amorph

In Tafel 2 sind in Wasser schwer lösliche Salze des Geomycins aufgeführt. Kristallisationsversuche hatten bisher nur beim Helianthinsalz Erfolg. Es schied sich aus verd. Methanol in roten Plättchen ab. Auch aus Formamid-Wasser sowie Methanol-Chloroform wurde es kristallisiert erhalten. Damit war die Möglichkeit gegeben, die weitere Reinigung des Antibioticums durch fraktionierte Kristallisation seines Helianthinsalzes vorzunehmen. Als Aus-

^{7a)} H. Brockmann, A. Bohne u. M. Bock, Dtsch. Bundes-Pat. 913 687.

gangsmaterial dafür eignet sich am besten das über das Pikrat gereinigte Hydrochlorid. Wie das Schema der fraktionierten Kristallisation (Tafel 3) zeigt, reichert sich das Antibioticum in den schwer löslichen Fraktionen an. Die beste Fraktion (IIIa) schmolz unter Zersetzung zwischen 205 und 215°. Ihre Analysenzahlen passen auf die Formel $(C_6H_{12}O_2N_2 \cdot C_{14}H_{15}O_3N_3S)_n$. Sie war gegen *St. aureus* bis $1:5 \times 10^5$ und gegen *E. coli* bis $1:5 \times 10^4$ wirksam. Da der Geomycingehalt des Helianthinsalzes 32% beträgt, ist die Wirksamkeit des reinen Antibioticums rund dreimal größer.

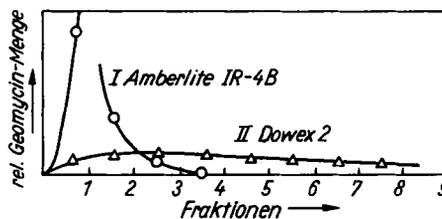
Tafel 3. Schema der fraktionierten Kristallisation des Helianthinsalzes



*) Wirksamkeit im Verdünnungstest

Das aus der besten Helianthinsalz-Fraktion (IIIa) gewonnene amorphe Geomycin-hydrochlorid, $[\alpha]_D^{20}$: $+16.0 \pm 0.4^\circ$ ($c = 3.25$, in Wasser) war gegen *St. aureus* bis $1:1.2 \times 10^6$ und gegen *E. coli* bis $1:1.6 \times 10^5$ wirksam. Aus seinen Analysenzahlen ergibt sich als kleinste Formel $C_6H_{12}O_2N_2 \cdot HCl$.

Aus dem Hydrochlorid läßt sich mit Amberlite IR-4B nur ein Teil der Salzsäure entfernen. Der Rest muß mit dem stark basischen Dowex 2 gebunden werden, der aber das Antibioticum teilweise zurückhält. Die Retention am stark basischen Austauscher (Abbild. 4) spricht für das Vorliegen saurer Gruppen.

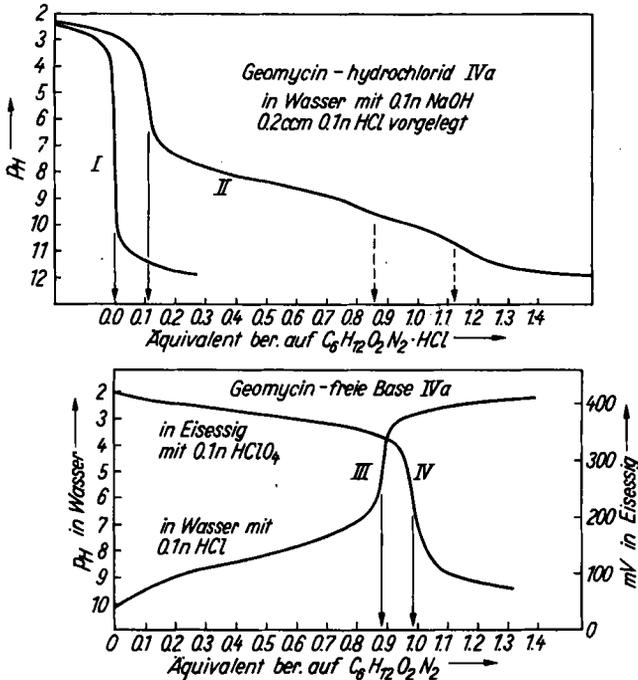


Abbild. 4. Verhalten von Geomycin-hydrochlorid an basischen Austauscher-Säulen

Für das freie Geomycin fanden wir in Übereinstimmung mit der oben angeführten Formel des Hydrochlorides als kleinste Formel $C_6H_{12}O_2N_2$. Später wiederholten wir, ausgehend von dem gleichen Geomycin-hydrochlorid, die fraktionierte Kristallisation des Helianthinsalzes, wobei die Fraktion IIIa nochmals umkristallisiert wurde. Die so gewonnene Fraktion IVa lieferte ein Geomycin-hydrochlorid, das weder in den Analysenzahlen, noch im UR-Spek-

trum von dem aus Fraktion IIIa abwich, und die gleichen Farbreaktionen (Tafel 1) wie das Rohprodukt gab.

Bei der potentiometrischen Titration von Geomycin-hydrochlorid in Wasser, dem eine bekannte Menge n HCl zugesetzt worden war, erhielten wir die Kurve II (Abbild. 5). Kurve I entspricht der zugesetzten Menge n HCl. Die bis zum ersten Wendepunkt der Kurve II verbrauchte Alkalimenge dient zweifellos



Abbild. 5. Titrationskurven des Geomycins

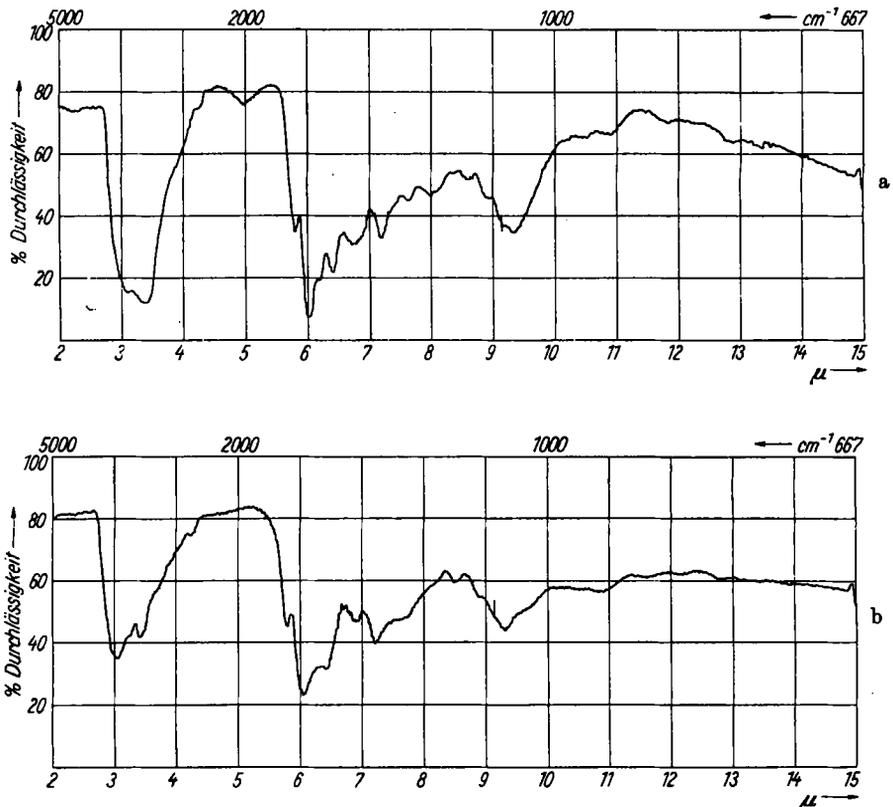
zur Neutralisation saurer Gruppen. Nimmt man an, daß Geomycin-hydrochlorid nur eine saure Gruppe enthält, so ergibt sich aus dem Alkaliverbrauch das Mol-Gew. 1650 ± 165 ($C_8H_{12}O_2N_2 \cdot HCl$)₈₋₁₀. Aus den beiden nur angedeuteten Wendepunkten der Kurve II läßt sich auf das Vorliegen von schwach und stark basischen Gruppen schließen, deren Zahlenverhältnis etwa 3:1 beträgt.

Geomycin, als freie Base potentiometrisch in Eisessig mit Überchlorsäure titriert, gab Kurve IV. Aus dem Säureverbrauch bis zum Wendepunkt errechnet sich das Äquivalentgewicht 147 ± 3 , das gut mit der kleinsten Geomycinformel $C_8H_{12}O_2N_2$ (144.2) übereinstimmt. Titration des Geomycins in Wasser lieferte Kurve III, die zeigt, daß der Säureverbrauch hier geringer ist. Wenn Geomycin, wie oben angenommen, eine saure Gruppe (Carboxygruppe) enthält, müßte diese in wäßr. Lösung mit einer basischen Gruppe des Geomycins ein Zwitterion bilden. Infolgedessen sollte in Wasser eine basische Gruppe weniger zu titrieren sein als in Eisessig. Aus der Differenz

im Säureverbrauch bei diesen beiden Titrationen müßte sich dann das gleiche Mol-Gew. ergeben wie aus Kurve II. Das ist innerhalb der Fehlergrenze tatsächlich der Fall, so daß wir als vorläufige Bruttoformel $(C_6H_{12}O_2N_2)_{8-10}$ annehmen.

Der nach van Slyke bei einer Reaktionsdauer von 5–10 Min. gefundene Aminostickstoff des Geomycins beträgt etwa ein Drittel des Gesamtstickstoffes und steigt nach vollständiger Hydrolyse auf zwei Drittel des Gesamtstickstoffes.

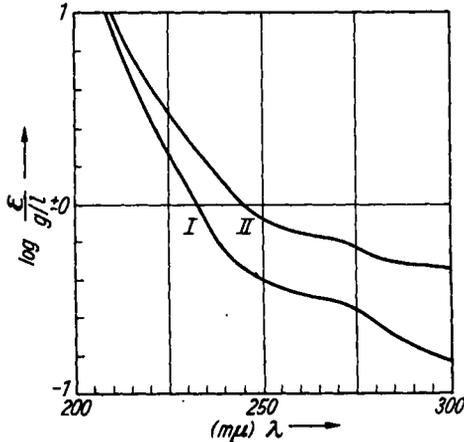
Abbild. 6 zeigt das UR-Spektrum des Geomycins und seines Hydrochlorides. Die Banden lassen sich folgendermaßen zuordnen: 3.00–3.50 μ : Überlagerung von C–H-, NH_3^+ - und durch H-Brücken beeinflussten N–H- bzw. OH-Valenzschwingungen. Die schwache Bande



Abbild. 6. UR-Spektren a) 950 γ Geomycin-hydrochlorid (IVa) b) 950 γ geomycin-freie Base IVa, beide in 200 mg Kaliumbromid gepreßt

bei 5.00 μ (im Hydrochlorid) kommt in vielen Aminosäure-hydrochloriden vor. 5.79 μ : Ester-carbonyl- oder CO_2H -Carbonyl-Valenzschwingungen. 6.05 μ Säureamid-carbonyl- oder $-C=N$ -Valenzschwingungen. 6.40 μ : NH-Deformationsschwingungen in Säureamidgruppen und NH_3^+ -Gruppen. Die Spektren sind bis auf die 5.79- μ -Bande der freien Base typisch für Verbindungen mit Peptidstruktur. Das UV-Spektrum ist wie bei Peptiden uncharakteristisch (Abbild. 7).

Die mit dem Ionenaustauscher IRC-50 aus der Kulturlösung der Stämme Geiss 786 und Ital 1142 isolierten Konzentrate wurden analog über die Pikratfällung in die reinen Hydrochloride übergeführt. Aus ihnen konnten ebenfalls kristallisierte Helianthinsalze erhalten werden, die sich untereinander und von dem des Stammes Wüst 70 nicht unterscheiden. Beide Hydrochloride waren, wie Tafel 4 zeigt, im Verdünnungstest gegen *St. aureus* und *E. coli* wirksamer als unser reinstes Geomycin-hydrochlorid aus Stamm



Abbild. 7. UV-Spektren: I, 12,6 mg Geomycin-hydrochlorid in 250 ccm Wasser; II, Maltotestlösung von 6,35 mg Geomycin-hydrochlorid auf 250 ccm verdünnt (3 Min. in *n* NaOH bei 100°)⁴⁾

Wüst 70. Dieser Unterschied kann durch die Ungenauigkeit des mikrobiologischen Testes bedingt sein. Er kann aber auch einen anderen Grund haben. Wie bereits oben erwähnt und weiter unten ausführlicher dargelegt, ist Geomycin ein Gemisch mehrerer sehr ähnlicher Antibiotica, die sich möglicherweise in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Abbild. 8 zeigt den papierchromatographischen Vergleich von Präparaten gleichen Reinheitsgrades aus den drei Stämmen. Das Geomycin aus Stamm Wüst 70 besteht demnach aus wenig Geomycin A und viel Geomycin B und C. Das Geomycin aus den Stämmen Geiss 786 und Ital 1142 ist aus wenig B, viel C und Spuren von zwei weiteren Komponenten (E und F, bei denen es sich vielleicht um Sekundärprodukte handelt) zusammengesetzt. Somit wird verständlich, daß sich zwischen den verschiedenen Präparaten (Tafel 4) Unterschiede in der antibiotischen Wirksamkeit finden.

Tafel 4. Vergleich der antibiotischen Wirksamkeit*) verschiedener Präparate

	<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Streptomycinsulfat	1:1300000	1: 530000
Neomycinsulfat	1:5700000	1:1000000
Wüst 70, Hydrochlorid	1:1000000	1: 160000
Geiss 786, Hydrochlorid	1:3000000	1: 175000
„ „ aus dem Mycel	1:2000000	1: 500000
Ital 1142, Hydrochlorid	1:2500000	1: 530000
„ „ aus dem Mycel	1:2000000	1: 250000

*) Mittelwerte aus 8-10 Testen, der mittlere Fehler liegt bei etwa 100 %.

Die im Mycel von Actinomyceten gebildeten Antibiotica werden nicht immer vollständig an die Kulturflüssigkeit abgegeben. So bleibt z.B. beim

Streptomycin⁸⁾, Streptothricin⁹⁾ und Rhodomycin¹⁰⁾ ein Teil im Mycel zurück und kann erst durch vorsichtige Behandlung mit Säure oder Alkali herausgelöst werden. Um zu prüfen, ob das gleiche auch beim Geomycin der Fall ist, haben wir das Mycel von Stamm Geiss 786 und Ital 1142 zunächst erschöpfend mit Petroläther, Äther und Aceton ausgezogen. Dabei wurden im wesentlichen Fette und fettähnliche Substanzen entfernt, die antibiotisch unwirksam sind. Als dann aber das Mycel mit einem Gemisch aus *n* HCl und Methanol (1:1) behandelt wurde, erhielten wir Extrakte mit beachtlicher antibiotischer Wirksamkeit. Bemerkenswert ist, daß auch bei mehrfacher Wiederholung der Extraktion die Wirksamkeit der Auszüge zunächst nur unerheblich abnahm. Offenbar ist ein Teil des Antibioticums im Mycel ester- oder peptidartig gebunden und wird erst durch die hydrolytische Wirkung der Säure freigelegt.

Die sauren Mycelauszüge wurden ebenso wie die sauren Eluate der Austauscher aufgearbeitet. Die über die Pikrate gereinigten Hydrochloride zeigten gegen *St. aureus* sowie *E. coli* etwa die gleiche antibiotische Wirksamkeit wie die aus den Kulturlösungen gewonnenen Geomycinpräparate. Die Ausbeute aus dem Mycel betrug etwa ein Drittel der aus der Kulturlösung erhaltenen.

Nach Mitteil. der Farbenfabriken Bayer war das dort von A. Bohne hergestellte Roh-Geomycinsulfat (*St. aureus* 1:1 000 000; *E. coli* 1:150 000)¹¹⁾ im Plattentest¹¹⁾ wirksam gegen *Proteus*-Bakterien, *Pneumobact. Friedländer*, *Bact. lactis aerogenes*, *Bact. faecalis alcaligenes*, Typhus und Paratyphus-Bakterien, Gärtner- und E-Ruhrbakterien sowie gegen Influenzabakterien. Wenig oder gar nicht gehemmt wurden *Enterokokken*, *Pneumokokken* und vergrünende *Streptokokken*. Das gleiche Präparat wirkte wie Streptothricin und Neomycin nephrotoxisch. Bei der mit *Entamoeba histolytica* infizierten Ratte war es nach Beobachtungen von Frl. Dr. M. Bock, Elberfeld, gut wirksam.

IV. Papierchromatographische Trennung der Geomycine

Wie oben erwähnt, bilden sich im Ring-Chromatogramm unserer rohen Geomycin-Präparate bei Anwendung des Systemes: Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (15:10:3:12) drei Zonen (Abbild. 8). Die gleiche Auftrennung trat auch bei unserem reinsten, aus kristallisiertem Helianthinsalz (Fraktion IIIa) gewonnenen Geomycin ein (Abbild. 9). Daß in den drei Zonen tatsächlich drei Antibiotica vorhanden sind, beweist der mikrobiologische Test, bei dem ein radial herausgeschnittener Streifen des Chromatogrammes auf mit *St. aureus* bzw. *E. coli* besprühten Agar-Platten bebrütet wurde. Abbild. 10 zeigt die drei Hemmzonen eines solchen Streifens: Wie bei den Actinomycinen¹²⁾ bezeichnen wir die Zonen von innen nach außen mit A, B, C und D und verwenden die gleichen Buchstaben zur Kennzeichnung der in diesen Zonen enthaltenen Geomycine.

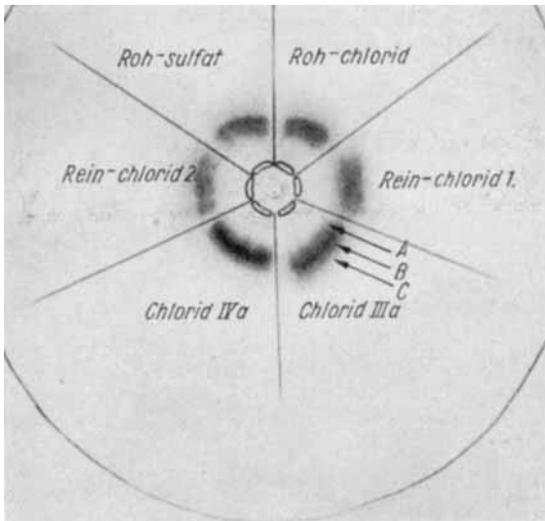
⁸⁾ G. Rake, W. Koeber u. R. Donovick, Amer. Pat. 2461922 [1949]; C. 1950 I, 2006.

⁹⁾ Vergl. D. Perlman, Bot. Rev. 19, 60 [1953].

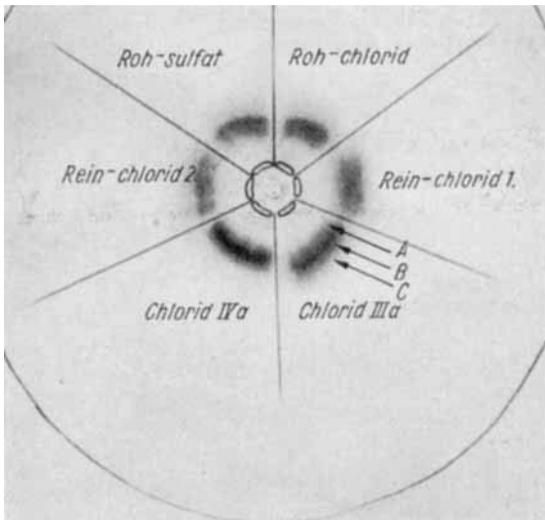
¹⁰⁾ H. Brockmann, K. Bauer u. I. Borchers, Chem. Ber. 84, 701 [1951].

¹¹⁾ Diese Teste wurden im Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer durchgeführt.

¹²⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

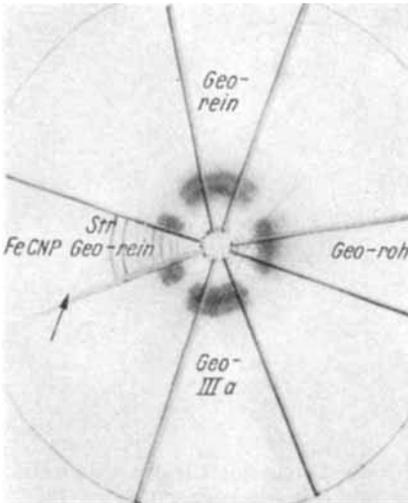


Abbild. 8. Papierchromatographischer Vergleich der Geomycine aus den Stämmen Wüst 70, Geiss 786 und Ital 1142. Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 15:10:3:12; 7 Stdn. bei 20°

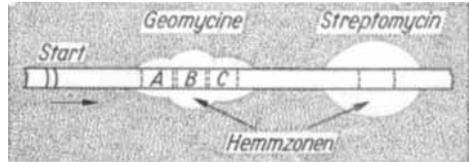


Abbild. 9. Papierchromatographischer Vergleich der Geomycinpräparate verschiedenen Reinheitsgrades aus Stamm Wüst 70. Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 15:10:3:12; 7 Stdn. bei 20°

Aus den Ring-Chromatogrammen der Abbild. 9 ist zu ersehen, daß reines Geomycin-hydrochlorid mehr Geomycin C enthält als das rohe Hydrochlorid, das als Ausgangsmaterial für die fraktionierte Kristallisation des Helianthinsalzes verwendet wurde. Bemerkenswert ist, daß das Geomycin aus der Helianthinsalz-Fraktion IVa im Chromatogramm nur die Zone A und wenig B zeigt (Abbild. 9).

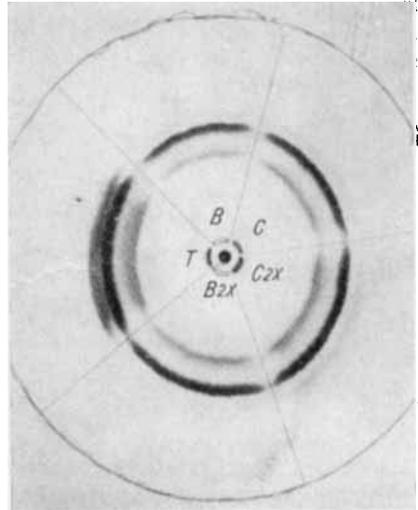
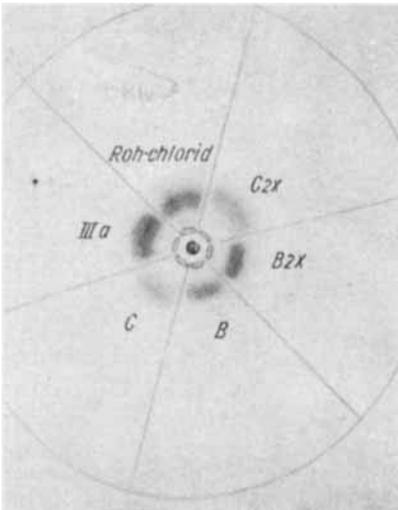


Um zu sehen, ob sich die Geomycine durch das Papierchromatogramm ihrer Hydrolysate unterscheiden, haben wir 9 mg Geomycin-hydrochlorid (Fraktion IIIa) im Ring-Chromatogramm präparativ in die Komponenten B und



Abbild. 10. Teststreifen aus einem Ring-Chromatogramm nach dem Bebrüten auf der *St. aureus*- bzw. *E.-coli*-Agar-Platte. Der Streifen stammt aus der mit dem Pfeil bezeichneten Stelle des Chromatogramms. Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 15:10:3:12

C zerlegt und diese hydrolysiert. Die Sektoren-Chromatogramme (Abbild. 11) der beiden Hydrolysate stimmen vollkommen überein. Neben Spuren anderer Abbauprodukte zeigen sie nur die beiden ninhydrinpositiven Zonen,



Abbild. 11. Chromatogramme der reinen Geomycine B und C, a) (links) vor, b) (rechts) nach der Hydrolyse. 1 und 2 mal aufgetragen, T= Testgemisch. a) Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser 15:10:3:12; $4\frac{1}{4}$ Std. bei 22° ; b) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser 30:2:20

die bereits in den Hydrolysaten der Geomycin-Rohprodukte vorhanden sind. Die weitgehend angereicherte Komponente A (Präparat IV a) zeigt nach der Hydrolyse genau das gleiche Chromatogramm.

Geomycin A, B und C sind demnach einander sehr ähnlich. Wieweit sie sich quantitativ im Mengenverhältnis ihrer Abbauprodukte unterscheiden, wurde noch nicht bestimmt. Nach der halbquantitativen Schätzung der Papierchromatogramme ist kein Unterschied zu erkennen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemie sowie den Farbenfabriken Bayer, Werk Elberfeld, danken wir für großzügige Förderung unserer Arbeiten.

Die mikrobiologischen Tests und Kulturansätze wurden von Frau I. Parow, Frau E. Holzgrabe und von Frau E. Musso durchgeführt.

Beschreibung der Versuche*)

Kultur der Stämme: Die aus Erdproben isolierten Stämme Wüst 70, Geiss 786 und Ital 1142, die in 250-ccm-Erlenmeyer- und P-Kolben auf der üblichen Glycerin-Kaliumnitrat-Nährlösung bei 27° kultiviert wurden, zeigten unterschiedliches Wachstum. In einem Teil der P-Kolben wurde die Kulturlösung braun (p_H 7–8), enthielt viel Mycel und war gegen *St. aureus* bis zu Verdünnungen von 1:200, gegen *E. coli* bis zu Verdünnungen von 1:20 wirksam; bei anderen hatte sich wenig Mycel gebildet, und die schwach-gelbe Kulturlösung (p_H 6–7) war gegen *St. aureus* nur bis 1:20 wirksam. Aufgearbeitet wurde nach 4 bis 7 Wochen.

Stamm Wüst 70 wurde auch auf der Glycerin-Kaliumnitrat-Lösung in 500-l-Ansätzen im Submersverfahren kultiviert, wobei man nach 100 Stdn. aufarbeitete.

1. Charakterisierung der Austauscher

Amberlite IRC-50 a) maximale Kapazität: 1 g Amberlite IRC-50 (Korngröße 0.3–0.5 mm, Wassergehalt 48.7%) wurde 24 Stdn. in 2*n*HCl aufbewahrt, anschließend mit dest. Wasser gewaschen, bis dieses neutral abließ und dann mit 15 ccm *n* NaOH übergossen. Bei der Rücktitration nach 27 Stdn. wurden 9.65 ccm *n* HCl verbraucht. Kapazität: 5.35 m Äquival./g Amberlite (lufttrocken), 10.4 m Äquival./g Amberlite (wasserfrei).

b) Durchlaufkapazität: In ein mit Wasser gefülltes Chromatogrammrohr (6 × 0.66 cm; Ablaufrohr mit einem Quetschhahn verschlossen), an dessen oberem Ende als Flüssigkeitsreservoir ein 8 × 1.5-cm-Rohr angeschmolzen war, gab man 1 g Amberlite IRC-50, der sich gleichmäßig und ohne Luftblasen absetzte. Anschließend behandelte man 12 Stdn. mit 2*n*HCl und wusch nach, bis das Filtrat neutral abließ (9 ccm H₂O). Das Vol. des Austauschers (1.5 ccm) änderte sich dabei nicht. Anschließend gab man mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0.2 ccm/Min. 10 ccm *n* NaOH durch die Säule (Austauscher vergrößerte infolge Quellung sein Volumen um 85%) und wusch mit 9 ccm nach. Filtrat und Waschflüssigkeit wurden vereinigt und verbrauchten 4.65 ccm *n* HCl. Durchlaufkapazität: 5.35 m Äquival./g lufttrockenen Amberlites, entspr. 3.56 m Äquival./ccm (lose geschüttet). Bei dieser Durchlaufgeschwindigkeit wird die Kapazität also voll ausgenutzt.

Auf die Na-Form des Austauschers gab man nun 10 ccm *n* HCl und titrierte den durchgelaufenen Salzsäure-Überschuß. Verbraucht wurden 4.78 ccm *n* NaOH. Das Vol. des Austauschers nahm ab und war nach dem Austausch um 6–7% größer als zu Beginn des Versuches. 97.5% der maximalen Kapazität wurden demnach schnell ausgenutzt. Freies Alkali wurde bedeutend langsamer ausgewaschen als freie Säure und erforderte daher viermal mehr Waschflüssigkeit.

*) Alle Schmp. wurden unter dem Heizmikroskop nach Kofler bestimmt und sind nicht korrigiert. Zur Analyse wurden alle Substanzen bei 50° i. Hochvak. über Diphosphorperoxyd getrocknet.

c) Durchlaufkapazität der mit Natriumhydrogencarbonat behandelten Säule: 2 Säulen aus 0.5 g Amberlite IRC-50 (H-Form) wurden mit 2 *n* HCl vorbehandelt und dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung solange gewaschen, bis der Durchlauf das gleiche p_{H} (8.4) hatte wie die aufgegebene Lösung. Dazu waren 75 ccm erforderlich und die Säule quoll um 80% ihres Volumens. Auf die eine der ausgewaschenen Säulen gab man 10 ccm *n* HCl (Durchlaufgeschwindigkeit 0.2 ccm/Min.), durch die andere 10 ccm *n* NaOH, wusch nach und titrierte Filtrat und Waschwasser zurück. Verbrauch: 7.57 ccm *n* NaOH bzw. 9.83 ccm *n* HCl. Bei p_{H} 8.4 waren demnach 91% der Carboxygruppen belegt, 6.4% noch frei.

d) Durchlaufkapazität des auf p_{H} 6.5 gepufferten Austauschers: Wie beim vorhergehenden Versuch wurden zwei Säulen aus je 0.5 g mit Salzsäure vorbehandeltem Austauscher mit 0.2 *m* Natriumphosphatpuffer p_{H} 6.5 umgesetzt, bis der Durchlauf p_{H} 6.5 zeigte. Dazu waren 95 ccm erforderlich, wobei die Säule um 35% ihres Volumens zunahm. Anschließend wurde wie beim vorhergehenden Versuch die eine Säule mit 10 ccm *n* HCl, die andere mit 10 ccm *n* NaOH gewaschen und der Durchlauf titriert. Verbrauch: 8.79 ccm *n* NaOH bzw. 8.52 ccm *n* HCl. Der Austauscher war demnach zu 45% belegt.

Amberlite IR-4 B a) maximale Kapazität: 1 g Austauscher (0.1–0.4 mm Korngröße; Wassergehalt 36%) wurde zunächst mit überschüssiger 2 *n* HCl in das Salz verwandelt, dann mit 0.5-proz. Ammoniak regeneriert und neutral gewaschen. Anschließend versetzte man mit 10 ccm *n* HCl und titrierte nach 32 Stdn. potentiometrisch zurück. Verbrauch an *n* NaOH: a) bis p_{H} 3.5:3.31 ccm; b) bis p_{H} 7.5:3.66 ccm; c) bis p_{H} 9.0:7.5 ccm. Besonders im schwach alkalischen Bereich stellte sich das Gleichgewicht relativ langsam ein. 1 g Amberlite IR-4 B (lufttrocken) neutralisierte 6.3 m Äquival. Säure (Neutralisationspunkt p_{H} 7.5).

b) Durchlaufkapazität. Durch eine Säule aus 1 g Austauscher, die wie beim vorhergehenden Versuch mit Ammoniak vorbehandelt war, gab man 10 ccm *n* HCl (Durchlaufgeschwindigkeit 0.2 ccm/Min.). Der Austauscher quoll merklich, doch änderte sich das Volumen kaum. Beim Auswaschen konnte selbst mit 15 ccm Wasser die Säure nicht restlos entfernt werden, doch war ihre Konzentration in den letzten Anteilen Waschwasser sehr gering. Verbrauch des Durchlaufes an *n* NaOH a) bei 25 ccm Waschwasser 4.32 ccm, bei 30 ccm Waschwasser 4.51 ccm und bei 50 ccm Waschwasser 4.89 ccm. Kapazität: 5 m Äquival./g Austauscher (lufttrocken), 7.8 m Äquival./g Austauscher (trocken) bzw. 3.2 m Äquival./ccm Austauscher (lose geschüttelt).

Zur Neutralisation eignet sich neben der OH-Form auch die Carbonat-Form. Wird sie in Säulenform angewandt, so muß die Konzentration der zu neutralisierenden Säure so niedrig sein, daß das freiwerdende Kohlendioxyd gelöst bleibt.

2. Abtrennung der Antibiotica durch Kationenaustauscher

Vorversuche: Verwendet wurden drei verschiedene Säulen (4.3 ccm × 0.66 ccm; Vol. 1.5 ccm) folgender Vorbehandlung: I. reine H-Form; II. mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung behandelt; III. mit Phosphatpuffer p_{H} 6.5 vorbehandelt. Auf diese Säulen goß man 10 ccm der auf p_{H} 8.5–9.0 eingestellten Kulturlösungen (Durchlaufgeschwindigkeit 0.2 ccm/Min.) und wusch mit Wasser nach. Anschließend eluierte man bei gleicher Durchlaufgeschwindigkeit mit 10 ccm 0.5 *n* HCl. Die Filtrate der Kulturlösungen sowie die mit 4 *n* NaOH neutralisierten Eluate wurden im Verdünnungstest gegen *St. aureus* und *E. coli* getestet. Eine kleine Menge der auf p_{H} 8.5–9 eingestellten Kulturlösung blieb als Kontrolle zurück und wurde nach Beendigung des Versuches, der etwa 2 Stdn. dauerte, neutralisiert und getestet, um festzustellen, ob die Antibiotica durch die alkalische Reaktion der Lösung verändert waren.

Bei den Kontrollversuchen mit Streptomycin wurden 10 ccm einer 0.0125-proz. Streptomycinsulfatlösung auf die Säule gegeben. Als Beispiel dieser Vorversuche ist im folgenden die Untersuchung der Kulturlösung des Stammes Wüst 70 beschrieben.

Abtrennung des Antibioticums aus Stamm Wüst 70: Die dunkelbraune Kulturlösung zeigte bevor und nachdem sie 3 Stdn. bei p_H 9.0 gestanden hatte, folgende Wirksamkeit. Vorher: *St. aureus* 1:200 gehemmt, *E. coli* 1:20 gehemmt. Nachher: *St. aureus* 1:200 gehemmt, *E. coli* 1:10 gehemmt.

Tafel 5. Abtrennung des Antibioticums aus Stamm Wüst 70

Säule	Farbe	p_H	Wirksamkeit
I. a) Durchlauf	hellbraun	4.5	unwirksam
b) Eluat	hellbraun	1.0	<i>St. aureus</i> 1:200; <i>E. coli</i> 1:10
II. a) Durchlauf	braun	8.5	unwirksam
b) Eluat	farblos	1.0	<i>St. aureus</i> 1:200
III. a) Durchlauf	braun	7.0	unwirksam
b) Eluat	farblos	1.0	<i>St. aureus</i> 1:200

Um zu prüfen, ob beim Neutralisieren mit der OH-Form des Amberlite IR-4 B die Wirksamkeit verloren geht, wurden angesäuerte Proben der Kulturlösung so neutralisiert und getestet. Ein Verlust an Wirksamkeit war nicht festzustellen.

Präparative Abtrennung des Antibioticums aus Stamm Geiss 786: 300 g Amberlite IRC-50 (unter Wasser lose geschüttet 400 ccm) wurden in einem Chromatogrammrohr 24 Stdn. lang mit 1.5 l 2*n* HCl behandelt und anschließend solange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat neutral abfloß. Anschließend verrührte man den Austauscher in einem Becherglas mit 1.5 l 0.2 *m* Natriumphosphatpuffer p_H 6.5, wobei der p_H -Wert langsam abnahm, gab dann 4*n* NaOH tropfenweise zu, bis der p_H -Wert wieder auf 6.5 gestiegen war (erforderlich 165 ccm Lauge), schlammte in ein Chromatogrammrohr (4 × 120 cm) ein (Vol. der Säule 750 ccm) und wusch bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 l/Stde. mit Pufferlösung, bis das Filtrat p_H 6.5 zeigte (erforderlich 8.5 l). Anschließend wurde mit 3 l Wasser nachgewaschen. Durch diese Säule filtrierte man mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 l/Stde. 37 l brauner Kulturlösung des Stammes Geiss 786 (nach vier Wochen langer Bebrütung bei 27° aus 50 P-Kolben erhalten; Wirksamkeit: *St. aureus* 1:100, *E. coli* 1:10). Die Kulturlösung wurde überall, wo sie mit Luft in Berührung kam, mit Toluol überschichtet, um ein weiteres Wachstum noch vorhandener Zellen zu verhindern. Der Durchlauf war braun und unwirksam. Anschließend wusch man die Säule mit Wasser, bis die Waschflüssigkeit farblos abließ und eluierte mit 0.5 *n* HCl; Durchlaufgeschwindigkeit 1 l/Stde. Das Filtrat wurde in Fraktionen von 0.5 l aufgefangen. Von jeder Fraktion titrierte man 10 ccm mit 1*n* NaOH und testete die so neutralisierten Proben gegen *St. aureus* und *E. coli*. Die Ergebnisse sind in Abbild. 1 wiedergegeben.

In die vereinigten, hellgelben Fraktionen V und VI rührte man bis p_H 6 Amberlite IR-4 B (OH-Form) ein und verdampfte nach Entfernung des Austauschers i. Vak. zur Trockene. Den getrockneten Rückstand extrahierte man mit Methanol (Rückstand Natriumchlorid) und verdampfte wiederum i. Vak. Der Rückstand, ein hellbrauner, hygroskopischer Lack (3.7 g), war gegen *St. aureus* bis 1:7.5 × 10⁶, gegen *E. coli* bis 1:5 × 10⁴ wirksam. In analoger Weise wurden die Kulturlösungen der Stämme Wüst 70 und Ital 1142 aufgearbeitet.

3. Abtrennung des Geomycins aus der Kulturlösung durch Aktivkohle und Reinigung über das Pikrat

Bevor das Verfahren mit Ionenaustauschern entwickelt worden war, wurde das Kohle-Adsorbat eines 500-l-Ansatzes aufgearbeitet. Die Kulturlösung (500 l, *St. aureus* 1:1 × 10³; *E. coli* 1:75) wurde bei p_H 8–9 mit 1.5 kg Aktivkohle (E. Merck) verrührt; sodann wurde die Kohle abfiltriert und gewaschen. Die feuchte Paste (5 kg) wurde mit einem Gemisch von 6 l Aceton und 4 l Wasser (mit etwa 35 ccm konz. Schwefelsäure auf p_H 2 eingestellt), 2 Stdn. gerührt und nach dem Filtrieren noch zweimal genau so eluiert.

Die vereinigten rotbraunen Lösungen neutralisierte man mit Bariumhydroxyd bis p_H 6.5 bis 7, zentrifugierte das Bariumsulfat ab und engte i. Vak. bei 40° auf 2 l ein. Diese Lösung (enthält 100–200 g feste Substanz) rührte man in 3 l heiß gesättigte, wäBr. Pikrinsäure ein, wobei das Pikrat als braunes Öl ausfiel. Über Nacht setzte es sich gut ab und wurde dann in 1 l Methanol unter Zusatz der erforderlichen Menge konz. Salzsäure gelöst und die braune Lösung in das 10fache Vol. Äther gefällt. Das braune glasige Hydrochlorid (ca. 45 g) war gegen *St. aureus* $1:1 \times 10^5$ und *E. coli* $1:1 \times 10^4$ wirksam.

Reinigung mit Aktivkohle und über das Pikrat: Eine Lösung von 5 g rohem Geomycinsulfat in 70 ccm Wasser wurde mit 3 Tropfen $2nH_2SO_4$ angesäuert und portionsweise mit insgesamt 5 g Aktivkohle verrührt, bis die überstehende Lösung fast farblos war. Die Kohle wusch man mit sehr verdünnter Schwefelsäure (p_H 2–3) steigender Konzentration, bis sich die Eluate gelblich färbten, stellte die vereinigten Filtrate mit Bariumhydroxyd auf p_H 8.0 ein, filtrierte vom ausgefallenen Bariumsulfat ab und ließ das Filtrat bei 50° unter Rühren in 400 ccm kalt gesätt. Pikrinsäurelösung eintropfen. Das ausgefallene zähflüssige Pikrat wurde mit wenig Wasser gewaschen und dann getrocknet. Seine Lösung in 80 ccm Methanol und 4.5 ccm konz. Salzsäure ließ man bei 0° unter Rühren in 500 ccm absol. Äther eintropfen. Das in farblosen, klebrigen Flocken ausgeschiedene Hydrochlorid saugte man ab, wusch mit Äther, löste in 20 ccm absol. Methanol, filtrierte die hellgelbe Lösung bei 30° über 0.2 g Aktivkohle und gab das Filtrat tropfenweise in 200 ccm absol. Äther. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde viermal mit 200 ccm absol. Äther gewaschen (Äther durch Dekantieren abgetrennt) und i. Vak. über Kaliumhydroxyd und konz. Schwefelsäure getrocknet. Ausb. 1.7 g farbloses, stark hygroskopisches Hydrochlorid (Präparat 1). $[\alpha]_D^{20}$: $+8.9 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.8$, in Wasser). Gehalt an anorganischen Salzen 0.3%. *St. aureus*: $1:1 \times 10^6$, *E. coli*: $1:1.6 \times 10^5$. Aus 11.3 g rohem, analog verarbeiteten Geomycinhydrochlorid, das bereits durch eine Pikratfällung gereinigt worden war, erhielten wir 17.8 g Pikrat und daraus 8.9 g gereinigtes Hydrochlorid (Präparat 2).

4. Kristallisation des Geomycin-helianthinsalzes

Das Geomycin-helianthinsalz löst sich gut in Formamid, mäßig in heißem Tetrahydrofuran, Wasser und Methanol und sehr wenig in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln. Es kristallisierte aus einer bei 40 – 50° gesätt. Lösung in Methanol-Wasser (1:1) bei sehr langsamem Abkühlen in dunkel rotbraunen Kristallbüscheln (mikroskopisch gelblichen Plättchen); ferner als seine konz. warme Lösung in Formamid mit heißem Wasser verdünnt und sehr langsam abgekühlt wurde und schließlich auch, als seine heiß gesättigte Lösung in absol. Methanol mit dem 8–10fachen Vol. Chloroform verdünnt und 10 bis 14 Tage bei 20° gehalten wurde (rote, handschuhförmige Plättchen).

Fraktionierte Kristallisation des rohen Geomycin-helianthinsalzes: Eine Lösung von 2 g rohem Geomycin-hydrochlorid in 100 ccm Wasser ließ man unter Rühren bei 40° innerhalb 2 Stdn. in eine Lösung von 4 g Helianthin in 800 ccm Wasser eintropfen und kühlte langsam auf 0° . Der rotbraune, teilweise kristalline Niederschlag, im folgenden als Fraktion 0 bezeichnet, wurde zweimal mit Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet (4.0 g). Wirksamkeit gegen *St. aureus* $1:5 \times 10^5$, gegen *E. coli* $1:2 \times 10^4$. Das Filtrat des Niederschlages war unwirksam.

4.2 g Fraktion 0 rührte man langsam in 615 ccm kochendes absol. Methanol ein, setzte dann langsam unter Rühren die gleiche Menge kaltes Wasser hinzu und regelte die Temperatur so, daß sie am Schluß 43° betrug. In Methanol-Wasser 1:1 löst sich das Helianthinsalz bedeutend langsamer. Geht man mit der Temperatur über 45° , so wird der Niederschlag klebrig und ballt sich zusammen, und es dauert noch länger, bis vollständige Lösung eintritt. Dann wurde im Wasserbad innerhalb von 12 Stdn. auf 0° abgekühlt, wobei sich Fraktion Ia ausschied. Aus der Mutterlauge erhielt man nach Einengen i. Vak. auf 600 ccm Fraktion Ib und aus deren Mutterlauge durch Verdampfen Fraktion Ic. Anschließend wurde jede dieser drei Fraktionen noch zweimal fraktioniert kristallisiert, wobei die folgenden Fraktionen in der Mutterlauge der vorhergehenden gelöst wurden. Tafel 3 unterrichtet über die Ausb. und Wirksamkeiten, Tafel 6 über die Analysen der Endfraktionen.

Tafel 6. Analysen der Helianthinsalz-Fractionen

Fraktion	IIIa	IIIb	IIIc	IIId	IIIe
Ausbeute %	26.7	16.9	11.7	15.2	15.4
Aussehen	dunkelrot krist.	dunkelrot krist.	dunkelrot z. Tl. krist.	rot z. Tl. krist.	hellrot z. Tl. krist.
% N	15.45	15.24	15.37	15.17	13.15
% S	7.26	6.96	6.77	6.25	5.33
% Rückstand bei der S-Best.	0.038	0.233	0.214	1.44	13.95
% Helianthin-Ion a. d. S-Gehalt	67.6	66.3	64.4	59.4	50.7

Das Helianthinsalz IIIa verwittert beim Trocknen, ist schwach hygroskopisch, sintert ab 196° und schmilzt unter Zers. ab 200°.

$C_6H_{12}O_2N_3 \cdot C_{14}H_{18}O_3N_3S$ (449.5) Ber. C 53.43 H 6.06 O 17.80 N 15.58 S 7.13
Gef. C 53.07 H 6.11 N 15.45 S 7.26

Der gleiche Fraktionierungsversuch wurde ein Jahr später mit dem gleichen Ausgangsmaterial wiederholt, wobei die Spitzenfraktionen IIIa–c nochmals umkristallisiert wurden und so die Spitzenfraktionen IVa, IVb und IVc lieferten. 4.0 g rohes Geomycinhydrochlorid gaben 7.8 g Helianthinsalz (Fraktion 0), aus dem 1.2 g IVa (dunkelrot gut kristallisiert), 0.87 g IVb (kristallisiert) und 1.8 g IVc (z. Tl. klebrig) erhalten wurden. IVa sinterte bei 198° und schmolz unter Zers. zwischen 205 und 215°.

Gef. C 53.37 H 6.22 O 17.90 N 15.66 S 7.31

Geomycin-hydrochlorid aus dem Helianthinsalz: Eine Suspension von 1.33 g trockenem, sehr fein gepulvertem Geomycin-helianthinsalz (Fraktion IIIa) in 20 ccm absol. Methanol versetzte man unter Reiben in einer Reibschale tropfenweise mit 1 ccm konz. Salzsäure, filtrierte nach 10 Min. und entfärbte das Filtrat mit Aktivkohle. Die filtrierte Lösung wurde i. Vak. auf 5 ccm eingeeengt und unter Rühren in 120 ccm absol. Äther eingetragen. Der feinflockige, weiße Niederschlag wurde dreimal mit 100 ccm absol. Äther dekantiert und i. Vak. über konz. Schwefelsäure und Kaliumhydroxyd getrocknet. Ausb. 293 mg (55% d. Th.). Dieses im folgenden als IIIa gekennzeichnete Geomycin-hydrochlorid, ein hygroskopisches, farbloses Pulver, löst sich sehr gut in Wasser (p_H der 3-proz. wäbr. Lösung 2.5) und Methanol, weniger gut in Äthanol und gar nicht in Aceton, Essigester, Äther und Petroläther.

$C_6H_{12}O_2N_3Cl$ (180.6) Ber. C 39.89 H 7.26 O 17.71 N 15.51 Cl 19.63
Gef. C 39.86 H 7.28 O 18.52 N 15.33 Cl 19.60

Aminostickstoff nach van Slyke:

$(C_6H_{12}O_2N_3Cl)_8$ (1444.8) 6 Amino-N Ber. 5.82 Gef. 5.88*) 5.98**)

Amino-N nach saurer Hydrolyse Gef. 10.0*), 11.8**)

*) Reaktionszeit 5 Min. **) Reaktionszeit 10 Min.

Zur Hydrolyse wurden 16.5 mg in 5 ccm 6*N*HCl im Einschlußrohr unter Stickstoff 21 Stdn. auf 120° erhitzt. Die Lösung wurde i. Vak. unter Stickstoff verdampft, der Rückstand über Kaliumhydroxyd getrocknet und zur Aminostickstoff-Bestimmung in 2 ccm Wasser gelöst.

Geomycin-hydrochlorid aus Helianthinsalz (IVa): Aus 1.13 g Helianthinsalz (IVa) wurden 298 mg Hydrochlorid erhalten (69% d. Th.). $[\alpha]_D^{20}$: +16.0 ± 0.5° (c = 3.25, in Wasser).

$C_6H_{12}O_2N_3Cl$ (180.6) Ber. C 39.89 H 7.26 O 17.71 N 15.51 Cl 19.63
Gef. C 39.88 H 7.70 O 17.52 N 15.77 Cl 19.25
-NCH₃ 1.31; -OCH₃ 0.16

Geomycin aus Geomycin-hydrochlorid: Vorversuche wurden mit 2 mg Geomycin-hydrochlorid IVa in 0.2 ccm Wasser an 2 × 0.66-cm-Säulen der Austauscher Amberlite IR-4 B und Dowex 2 in der OH-Form gemacht (Abbild. 4). Eine Lösung von

99 mg Geomycin-hydrochlorid (IVa) in 0.5 ccm Wasser gab man auf eine Säule von Amberlite IR-4 B (OH-Form; 4×0.66 cm), wusch mit Wasser nach (0.1 ccm/Min.) und fing das Filtrat in Fraktionen von 0.35 ccm auf. Von jeder Fraktion brachte man einen Tropfen auf einen Streifen Filterpapier, trocknete und entwickelte mit Ninhydrin. An der Violettfärbung ließ sich leicht erkennen, welche Fraktionen Geomycin enthielten. Ferner wurde jede Fraktion auf Chlor-Ionen geprüft. Nachdem 3 ccm die Säule passiert hatten, war das Filtrat frei von Geomycin, doch waren die Geomycinfraktionen noch nicht chlorfrei. Sie wurden daher vereinigt und durch 0.5 g auf einer kleinen Trichter- nutsche befindlichen stark basischen Austauscher Dowex 2 (OH-Form) filtriert. Das chlorfreie Filtrat (p_H 10) hinterließ beim Verdampfen i. Vak. einen schwach gelblichen, hygrokopischen Rückstand (58 mg; 73% d. Th.).

$C_6H_{12}O_2N_2$ (144.2) Ber. C 49.98 H 8.39 N 19.43 Gef. C 49.48 H 8.91 N 20.25

Äquivalent- und Mol.-Gew.-Bestimmung durch Titration: Die Titrationsen in wäbr. Lösung wurden mit der alkalifesteren Glaselektrode, die Titrationsen in Eisessig nach H. Brockmann und E. Meyer¹³⁾ durchgeführt. Für die p_H - und Potentialmessungen diente ein p_H -Meter (Radiometer-Kopenhagen Nr. 22).

Kurve I (Abbild. 5). Blindwert: 0.2 ccm 0.1n HCl in 1.8 ccm Wasser verbrauchten 0.202 ccm (± 0.005 ccm) 0.1n NaOH.

Kurve II (Abbild. 5). 1. 39.0 mg Geomycin-hydrochlorid (IVa) in 1.7 ccm Wasser + 0.2 ccm 0.1n HCl; 2. 18.7 mg desselben Präparates in 1.8 ccm Wasser + 0.2 ccm 0.1n HCl. Verbrauch an 0.1n NaOH bis zum ersten Wendepunkt (nach Abzug des Blindwertes): 1. 0.23 ccm; 2. 0.116 ccm.

Mol.-Gew. $(C_6H_{12}O_2N_2 \cdot HCl)_{8-10}$ Ber. 1448–1806 Gef. 1690, 1610 \pm 165

Kurve III (Abbild. 5). 16.0 mg Geomycin (Base IVa) in 1.2 ccm Wasser verbrauchten bis zum Wendepunkt 0.982 ccm 0.1n HCl.

Kurve IV (Abbild. 5). 11.0 mg Geomycin (Base IVa) in 4.0 ccm Eisessig wurden mit 0.107n $HClO_4$ in Eisessig titriert. Während der Titration fiel ein flockiger, farbloser Niederschlag aus. Verbrauch bis zum Wendepunkt 0.70 ccm.

$C_6H_{12}O_2N_2$ Äquival.-Gew. Ber. 144.2 Gef. 147 \pm 3

Überführung der Antibiotica aus Stamm Geiss 786 und Ital 1142 in kristallisierte Helianthinsalze: Für diese Versuche dienten die mit Amberlite IRC-50 aus der Kulturlösung gewonnenen Konzentrate. 1.4 g Konzentrat aus Geiss 786 gab 394 mg Pikrat und dieses 267 mg farbloses Hydrochlorid. 1.1 g Konzentrat aus Ital 1142 lieferte 380 mg Pikrat und dieses 270 mg schwach gelbliches Hydrochlorid.

Eine Lösung von je 10 mg der beiden Hydrochloride in 1 ccm Wasser ließ man bei 50° in 5 ccm einer kaltesättigten Natrium-helianthinsalzlösung eintropfen. Die abzentrifugierten, zweimal mit wenig Wasser gewaschenen Niederschläge wurden bei 45° in der nötigen Menge 50-proz. Methanol gelöst und durch sehr langsames Abkühlen auf 0° zur Kristallisation gebracht. Die Kristalle zentrifugierte man ab und wusch sie mit wenig 50-proz. Methanol. Ausb. 3–5 mg. Schmp. unt. Zers. Geiss 786 200–205°, Ital 1142 205–215°.

Isolierung der Antibiotica aus dem Mycel der Stämme Geiss 786 und Ital 1142

Geiss 786: Das aus dem 37-l-Ansatz (dessen Lösung mit Ionenaustauschern aufgearbeitet wurde) abfiltrierte, getrocknete und zerriebene Mycel (27.8 g) wurde im Soxhlet-Apparat je einen Tag mit Petroläther, Äther und Aceton extrahiert. Die Rückstände nach dem Verdampfen der Lösungsmittel (Petroläther 0.66 g, Äther 0.16 g, Aceton 0.44 g) waren unwirksam. Das so vorbehandelte Mycel (26.4 g) wurde wiederholt bei 20° mit je 100 ccm einer Mischung aus n HCl und Methanol 1:1 30 Min. digeriert, filtriert und der Extrakt sofort mit Amberlite IR-4 B (OH-Form) auf p_H 6.0 neutralisiert und getestet. Das Maximum der Wirksamkeit lag in den Fraktionen II bis IV mit *St. aureus* > 1:1000 und *E. coli* > 1:1000. Nach dem Eindampfen der Fraktionen I bis IV i. Vak.

¹³⁾ Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

hinterblieben 2.6 g eines braunen, hygroskopischen Lackes (*St. aureus* $1:5 \times 10^5$ und *E. coli* $1:2.5 \times 10^4$); die Fraktionen V bis VIII gaben 2.4 g (*St. aureus* $1:3.5 \times 10^4$ und *E. coli* $1:6 \times 10^3$).

Reinigung über das Pikrat: 2.1 g des rohen Hydrochlorides aus Fraktion I bis IV gaben 1.3 g Pikrat und daraus konnten 170 mg reines Hydrochlorid erhalten werden (*St. aureus* $1:2 \times 10^6$, *E. coli* $1:5 \times 10^5$). Die zweite Portion (Fraktion V bis VIII) lieferte noch 49 mg Hydrochlorid der gleichen Wirksamkeit. Ein 13-l-Kulturanatz des Stammes Ital 1142 hatte 23.4 g Mycel gebildet und daraus wurden wie oben 4.182 g Rohprodukt (*St. aureus* $1:2 \times 10^5$, *E. coli* $1:2 \times 10^4$) und 181 mg gereinigtes Hydrochlorid (*St. aureus* $1:2 \times 10^6$, *E. coli* $1:2.5 \times 10^4$) erhalten.

5. Präparative Ring-Papierchromatographie des Geomycins

Eine Lösung von 9.0 mg Geomycin-hydrochlorid (IIIa) in 0.08 ccm Wasser wurde gleichmäßig auf die Startkreise von 10 Papierbogen (30 × 29 cm, Schleicher & Schüll 2043b) aufgetragen und mit Butanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (15:10:3:12) 6 Stdn. bei 18° chromatographiert. Nach Trocknen bei 110° (15 Min.) war im UV-Licht nur eine breite Zone zu erkennen. Daher wurden vier 3 mm breite Teststreifen radial zueinander im Winkel von 90° ausgeschnitten und mit Ninhydrin entwickelt. Danach konnten die Zonen B und C getrennt ausgeschnitten und mit 0.1n Essigsäure eluiert werden, wobei ein 2 mm breiter Streifen zwischen den Zonen, in dem diese etwas überlappten, verworfen wurde. Nach Eindampfen der Eluate hinterblieben 2.7 mg der Komponente B und 5.0 mg der Komponente C.

Hydrolyse von Geomycin B und C: Beide Fraktionen wurden im Einschlußrohr 13 Stdn. bei 120° hydrolysiert, und zwar B in 0.3 ccm Wasser + 0.7 ccm konz. Salzsäure, C in 0.5 ccm Wasser + 1.0 ccm konz. Salzsäure. Nach Verdampfen i. Vak. wurden die hellgelben Rückstände in Wasser (B in 0.03 ccm, C in 0.05 ccm) gelöst und in gleichen Mengen nebeneinander chromatographiert.