

10. Hans Brockmann und Günter Schmidt-Kastner: Valinomycin I, XXVII. Mitteil. über Antibiotica aus Actinomyceten¹⁾

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen]

(Eingegangen am 23. Oktober 1954)

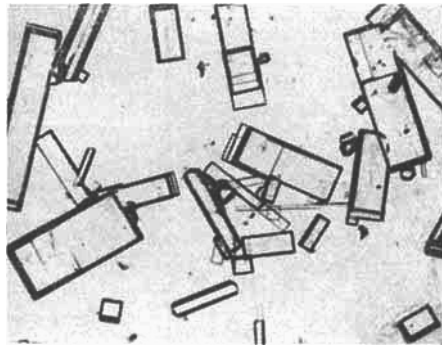
Aus einem zur species *Streptomyces fulvissimus* gehörenden Actinomyceten-Stamm wurde eine farblose, kristallisierte Verbindung $C_{36}H_{60}O_{12}N_4$ isoliert, die wegen ihres Valin-Gehaltes den Namen Valinomycin erhalten hat. Sie ist in vitro gegen *Mycobacterium tuberculosis* antibiotisch wirksam.

Wie bereits mitgeteilt²⁾, haben wir bei 125 im Plattentest wenig oder gar nicht wirksamen *Streptomyces*-Stämmen das Mycel auf schwerlösliche, antibiotische Inhaltsstoffe untersucht und dabei das in Wasser fast unlösliche Antibioticum Resistomycin²⁾ aufgefunden. Im Laufe dieser Arbeiten konnten wir aus dem Mycel eines zur species *Streptomyces fulvissimus* gehörenden Actinomyceten-Stammes³⁾ eine farblose, kristallisierte Verbindung abtrennen, die bei der Hydrolyse als einzige Aminosäure Valin liefert und daher im folgenden Valinomycin genannt wird.

Zur Gewinnung des Valinomycins haben wir unseren Stamm im Oberflächen-Verfahren auf einer Nährlösung kultiviert, die Glycerin und Natriumnitrat als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle enthielt. Das nach 20tägiger Bebrütung bei 27° angefallene Mycel wurde nacheinander mit Petroläther, Äther, Aceton und 80-proz. Methanol erschöpfend extrahiert.

Der Petrolätherauszug hinterließ beim Verdampfen einen farblosen, öligen Rückstand, aus dem sich das Valinomycin allmählich in farblosen Plättchen abschied. Durch fraktionierte Kristallisation aus *n*-Dibutyläther wurde es von Resten lipoider Begleitstoffe befreit. Weitere Valinomycinmengen fielen beim Einengen des Methanolextraktes aus. Beim Einsatz von 100 g Trockenmycel (aus etwa 45 l Kulturflüssigkeit) lieferte der Petrolätherextrakt etwa 0.5 g und der Methanolauszug 0.8 g kristallisiertes Valinomycin.

Auffällig ist, daß auch nach erschöpfender Extraktion des Mycels mit Petroläther, Äther und Aceton erhebliche Mengen Valinomycin im Mycel zurückbleiben und erst mit 80-proz. Methanol herausgelöst werden. Ob dieser Anteil in besonderer Weise im



Abbild. 1. Valinomycin aus *n*-Dibutyläther

¹⁾ XXVI. Mitteil.: H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].

²⁾ H. Brockmann u. G. Schmidt-Kastner, Chem. Ber. 87, 1460 [1954].

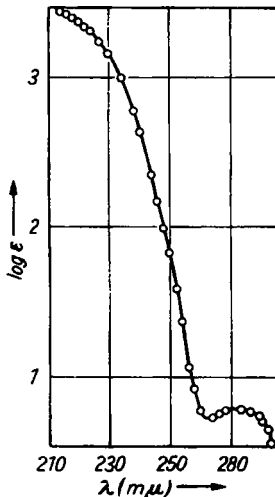
³⁾ Der zunächst als Ihr 582 bezeichnete Stamm wurde in unserem Institut von W. Lindenbein isoliert und als *Str. fulvissimus* erkannt; W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 370 [1952].

Mycel verankert ist, oder aber aus Zellen stammt, die beim Pulverisieren des getrockneten Mycels intakt bleiben und erst beim Behandeln mit Methanol durch Quellung zerstört werden, bleibt noch zu klären.

Valinomycin schmilzt bei 190° , ist optisch aktiv, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: $+31.0^{\circ}$ ($c = 1.6$ in Benzol), und läßt sich i. Hochvak. nicht sublimieren. Von den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln wird es leicht aufgenommen, in Wasser, $2n$ Salzsäure und $2n$ wäbr. Alkali dagegen ist es praktisch unlöslich. In konz. Schwefelsäure löst es sich farblos.

Die kleinste mit den Analysenzahlen in Einklang stehende Formel ist $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$ (185.2). Als Mol.-Gew. fanden wir nach Beckmann in Eisessig 713 und in Phenol 735. Danach ist die Bruttoformel des Valinomycins viermal größer als die kleinste Summenformel und beträgt $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{12}\text{N}_4$.

Valinomycin enthält fünf aktive Wasserstoff-Atome, dagegen keine Acetyl-, Methoxy- oder *N*-Methylgruppen. Bei der Oxydation nach Kuhn-Roth lieferte es 4 Moll. Essigsäure. Da Valinomycin in Eisessig auch i. Ggw. von reichlich Platin-katalysator keinen Wasserstoff aufnimmt, und sich weder mit Brom noch mit Permanganat Doppelbindungen nachweisen lassen, kann die bei der Kuhn-Roth-Oxydation gebildete Essigsäure nur gesättigten Systemen entstammen. Da bei solchen die Essigsäure-Ausbeute je *C*-Methylgruppe häufig weit unter 1 Mol. liegt⁴⁾, ist anzunehmen, daß Valinomycin mehr als vier *C*-Methylgruppen enthält.



Abbild. 2. Absorptionskurve des Valinomycins in *n*-Hexan. Von 214–256 $m\mu$ mit einer $0.611 \cdot 10^{-3}$ mol., von 256–286 $m\mu$ mit einer $0.922 \cdot 10^{-2}$ mol. Lösung gemessen

Der weitgehend gesättigte Charakter des Valinomycins, erkenntlich bereits an seinem hohen Wasserstoffgehalt, kommt auch in der wenig charakteristischen UV-Absorption (Abbild. 2) zum Ausdruck.

Valinomycin reagiert nicht mit Ninhydrin. Versuche, eine Aminostickstoff-Bestimmung nach van Slyke durchzuführen, scheiterten, weil beim Zusatz der Nitritlösung das Valinomycin quantitativ ausfiel. Daß keines der vier Stickstoff-Atome basischen Charakter hat, ergibt sich aus der Unlöslichkeit des Antibioticums in $2n$ Säure und noch deutlicher aus der potentiometrischen Titration in Eisessig mit Perchlorsäure⁵⁾, bei der keine Säure verbraucht wurde.

Da Valinomycin in $2n$ wäbr. Alkali unlöslich ist und nicht mit *p,p'*-Dimethylamino-diphenyl-carbodiimid reagiert, kann es keine Carboxygruppen enthalten.

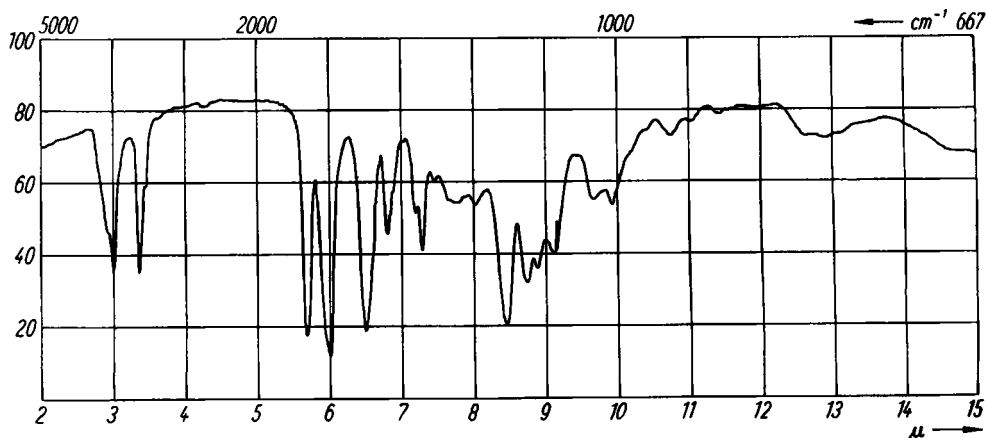
⁴⁾ A. D. Campbell u. J. E. Morton, J. chem. Soc. [London] 1952, 1693.

⁵⁾ H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

Das gegebene Abbauverfahren für die Konstitutionsaufklärung des Valinomycins ist die Hydrolyse, die wir zunächst in saurem Milieu untersucht haben. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit des Antibiotiums arbeiteten wir in Eisessig/25-proz. Salzsäure (4:1) und erhitzen 48 Std. auf 95°. Das Hydrolysat ließ sich durch Verteilung zwischen Äther und Wasser in zwei Fraktionen auftrennen. Die Untersuchung der sauer reagierenden Ätherfraktion wurde zunächst zurückgestellt. Die wäßr. Phase der Verteilung lieferte einen farblosen Rückstand, der im Papierchromatogramm bei der Entwicklung mit 1. Phenol/1-proz. Ammoniak, 2. *o*-Kresol, 3. Kollidin und 4. Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) nur einen ninhydrinpositiven Fleck zeigte. Seine R_F -Werte stimmten in allen vier Systemen mit denen des Valins überein.

Als unter den Bedingungen dieses Vorversuches 200 mg Valinomycin verarbeitet wurden, erhielten wir bei der Verteilung des Hydrolysates zwischen Äther und Wasser aus der wäßr. Phase eine farblose Fraktion, die bei 145°/10⁻³ Torr ohne Rückstand sublimierte. Aus der konzentrierten wäßr. Lösung dieses Sublimates schieden sich nach Zusatz von Äthanol Kristalle ab, die in dem oben genannten System die R_F -Werte des Valins zeigten und in ihren Analysenzahlen genau auf Valin paßten. An der Identität unseres Abbauproduktes mit Valin kann demnach kein Zweifel bestehen. Überraschenderweise war das Valin optisch inaktiv.

Daß unser Sublimat, dessen Ausbeute, auf Valinomycin bezogen, 57 % betrug, kein reines Valin mehr war, ergab sich aus seinem zu niedrigen N-Gehalt (9.05 % statt 11.96 %). Nimmt man an, daß sein Stickstoff allein von Valin herrührt, so enthält es davon 75 %. Das sind, bezogen auf das eingesetzte Valinomycin, nahezu 3 Moleküle. Da bei der Aufarbeitung des Hydrolysates, insbesondere bei seiner Verteilung zwischen Äther und Wasser, mit Verlusten zu rechnen ist, läßt sich durchaus die Annahme vertreten, daß Valinomycin 4 Moll. Valin enthält und sein Stickstoffgehalt demnach ausschließlich dieser Aminosäure zuzuordnen ist.



Abbild. 3. Infrarot-Spektrum des Valinomycins (0.8 mg in 300 mg KBr gepreßt)

Das im KBr-Preßling aufgenommene Infrarot-Spektrum (Abbild. 3) zeigt drei Banden bei 3.06, 6.02 und 6.53 μ , die monosubstituierten Säureamidgruppen zuzuordnen sind. Eine starke Bande bei 5,70 μ zeigt das Vorliegen einer oder mehrerer Ester-carbonylgruppen an.

Die antibiotische Wirksamkeit des Valinomycins gegen *St. aureus* und *Bac. subtilis* ist gering; als wirksame Grenzkonzentrationen fanden wir 1:30000 bzw. 1:20000. Besser war die Wirksamkeit gegen virulente humane Stämme von *Mycobacterium tuberculosis*, gegen die Valinomycin in Kirchner-Medium bei Zusatz von 5% Serum bis zu Verdünnungen von 1:900000 wirksam war⁶⁾.

Auf Hohnschem Eiernährboden lag bei Verwendung anderer Tbc-Stämme die Grenzkonzentration gegen *Mycobacterium tuberculosis* bei 1:10000⁷⁾.

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

Beschreibung der Versuche

Unser aus einer Erdprobe isolierter und zur species *Str. fulvisimus* gehörender Stamm wurde in P-Kolben auf einer Nährlösung folgender Zusammensetzung kultiviert: 2 Vol.-% Glycerin; 0.85% Natriumnitrat; 0.18% Kaliumdihydrogenphosphat; 0.12% Dikaliumhydrogenphosphat; 0.05% Eisen(II)-sulfat; 0.2% Natriumchlorid; 0.05% Magnesiumsulfat; 5 Vol.-% Hefekochsaff.

Zur Bereitung des Hefekochsaftes bebrütete man 100 g Trockenhefe in 1 l Leitungswasser 60 Min. bei 27°, erhitze kurz im Autoklaven auf 110° und dekantierte vom Ungerösteten ab. Ohne Zusatz der angegebenen Menge Hefekochsaff war das Wachstum unseres Stammes mäßig.

Als Impfmateriale diente eine Vorkultur auf der oben angegebenen Nährlösung (ohne Hefekochsaff). Um gleichmäßiges Oberflächenwachstum zu erzielen, wurden die P-Kolben 5 Stdn. nach der Beimpfung durchgeschüttelt. Nach 20-tägiger Kultur bei 27° wurde das weißversportete Mycel von der braunen, gegen *St. aureus* und *Bact. coli* unwirksamen Nährlösung abfiltriert, noch feucht in Trockeneis ausgefroren und nach Auftauen und Absaugen der Flüssigkeit bei 50° i. Vak. getrocknet. Ausbeute an Trockenmycel 2.3 g/l Kulturflüssigkeit.

Isolierung des Valinomycins: 100 g feingepulvertes Mycel wurden im Soxhlet-Apparat 5 Tage mit Petroläther (spezif. Gew. 0.66–0.88), dann 2 Tage mit Äther, 2 Tage mit Aceton und schließlich 5 Tage mit 80-proz. Methanol extrahiert. Den Petrolätherextrakt engte man bis zur öligen Konsistenz ein und bewahrte ihn bei 20° auf. Das auskristallisierte Valinomycin wurde auf einer Glasfritte (G 2 Schott) von der öligen Mutterlauge abgetrennt und mit wenig *n*-Dibutyläther gewaschen.

Den gelbbraunen, trüben Methanolauszug dampfte man nach Zusatz von Antischaummittel i. Vak. ein und trennte das ausgefallene Valinomycin ab.

Zur weiteren Reinigung wurde aus *n*-Dibutyläther umkristallisiert, aus dem sich das Valinomycin in farblosen, glänzenden rechteckigen Plättchen abschied. Nach 2–3 maligem Umkristallisieren lag der Schmp. konstant bei 190° (Berl-Block), $[\alpha]_D^{25}$: +31.0° (*c* = 1.6, in Benzol). Valinomycin ist gut löslich in Petroläther, Äther, Benzol, Chloroform, Eisessig, Butylacetat und Aceton.

$C_{36}H_{60}O_{12}N_4$ (740.9) Ber. C 58.36 H 8.16 O 25.92 N 7.56 5 akt. H 0.68 4 C-CH₃ 8.1
Gef. *) C 58.34 H 8.25 O 25.82 N 7.48 akt. H 0.68 C-CH₃ 8.0

*) Getrocknet bei 70° i. Hochvak.

Gef. Mol.-Gew. 713^{*)}, 735^{**)}, 675, 775, 750^{***)}, 872^{****)}.

*) nach Beckmann in Eisessig **) in Phenol *** nach Rast in Campher ****) ebullioskop. in Chlorbenzol.

6) Diese Ergebnisse verdanken wir Hrn. Doz. Dr. Weitzel, Medizinische Forschungsanstalt Göttingen.

7) Diese Ergebnisse verdanken wir Hrn. Prof. Domagk, Farbenfabriken Bayer AG., Werk Elberfeld.

Antibiotische Eigenschaften des Valinomycins: Als Stammlösung für den Verdünnungstest mit *Staph. aureus*, *Bact. subtilis* sowie für die Tuberkulose-Teste auf Kirchner-Medium diente eine 0.1-proz. alkoholisch-wäßrige Lösung mit weniger als 2% Alkohol. Die antibiotisch wirksame Grenzkonzentration betrug bei *Staph. aureus* und *Bact. subtilis* 1:30000 bzw. 1:20000. Bei virulenten humanen Stämmen von *Mycobacterium tuberculosis* in Kirchner-Medium unter Zusatz von 5% Serum 1:900000.

Als Stammlösung für die auf Hohnschem Eiernährboden durchgeführten Tbe-Teste sowie für die Trypanosomen-Versuche diente eine 5-proz. stabilisierte wäßr. Suspension des Valinomycins. Die wirksame Grenzkonzentration gegen *Mycobacterium tuberculosis* auf Hohnschem Eiernährboden betrug 1:10000. In der *Dosis tolerata* und in der halben *Dosis tolerata* war Valinomycin gegen *Trypanosoma-brucei*-Infektionen der weißen Maus wirksam. Für eine praktische Verwendung ist die Trypanosomen-Wirksamkeit zu gering, jedoch ist zu berücksichtigen, daß nicht eine Lösung, sondern lediglich eine Kristallsuspension subcutan injiziert wurde.

Abbau des Valinomycins zu DL-Valin: In einem Vorversuch wurden 5 mg Valinomycin in einer Mischung von 1 ccm Eisessig und 0.5 ccm 25-proz. Salzsäure 48 Stdn. auf 95° erhitzt. Der beim Verdampfen im Exsiccator hinterbliebene Rückstand des Hydrolysates wurde in Wasser aufgenommen und die Lösung mit Äther extrahiert. Die wäßr. Phase erhitze man kurz mit Silbercarbonat, schüttelte das neutrale Filtrat nochmals mit Äther durch und verdampfte es zur Trockne. Die wäßr. Lösung des Rückstandes, die starke Ninhydrinreaktion gab, wurde zur Papierchromatographie verwendet. In vier verschiedenen Systemen zeigte sich nur ein ninhydrinpositiver Fleck mit folgenden R_F -Werten: Phenol + 1% Ammoniak (24-proz.): 0.76 (Valin 0.75); o-Kresol: 0.39 (Valin 0.37); Kollidin: 0.40 (Valin 0.40); Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5): 0.45 (Valin 0.44).

Eine Lösung von 200 mg Valinomycin in einer Mischung aus 8 ccm Eisessig und 2 ccm 25-proz. Salzsäure wurde 90 Stdn. auf 90° erhitzt. Der beim Eindunsten des Lösungsmittels (Exsiccator) hinterbliebene, farblose Rückstand wurde zur Entfernung überschüssiger Säure noch zweimal mit Wasser abgedampft und dann in wenig Wasser aufgenommen. Die so erhaltene saure Lösung schüttelte man dreimal mit Äther durch. Die mit Calciumchlorid getrocknete Ätherphase hinterließ einen farblosen, öligen Rückstand, der noch nicht näher untersucht wurde. Der Rückstand der wäßr. Phase ließ sich bei 145°/10⁻³ Torr quantitativ sublimieren. Ausbeute des Sublimates 57% des Ausgangsmaterials. Bei Zugabe von Äthanol zur konz. wäßr. Lösung des Sublimates kristallisierte optisch inaktives Valin aus.

$C_5H_{11}O_2N$ (117.2) Ber. C 51.26 H 9.47 N 11.96 Gef. C 51.00 H 9.25 N 11.80