

Grunde ist es gerechtfertigt, mit Hilfe der scheinbaren Dissoziationskonstanten in der üblichen Weise Rückschlüsse auf Konstitution und Konstellation von Dicarbonsäuren zu ziehen, wie in einer späteren Arbeit dieser Reihe am Beispiel substituierter Glutarsäuren gezeigt werden soll.

SUMMARY.

It is shown that the determination of apparent pK-values of aliphatic dicarboxylic acids in the nonaqueous solvent systems methylcellosolve/water and dimethylformamide/water by a previously described micromethod yields thermodynamically undefined values, which however show the same relative trend as thermodynamical pK-values measured in water. They are therefore liable to be correlated with the structure of acids by the usual semiquantitative rules.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

32. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten.

4. Mitteilung¹⁾.

Die Foromacidine A, B, C und D

von R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer,
E. Kyburz, L. Neipp, V. Prelog, A. Wettstein und H. Zähler.

(17. XII. 55.)

Aus zwei Bodenproben, von welchen die eine im Forum Romanum, Rom, und die andere im Malcantone, Kanton Tessin, Schweiz, gesammelt wurde, haben wir zwei *Streptomyces*-Stämme isoliert, die beide mehrere lipophile und hydrophile Antibiotica produzierten. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir vier mit Äthylacetat extrahierbare Basen, die wir Foromacidine A, B, C und D benannt haben. Diese sind für die antibiotische Aktivität der lipophilen Anteile verantwortlich und sind besonders gegenüber *Gram*-positiven Bakterien wirksam. Die hydrophilen Anteile, die nach der Extraktion mit Äthylacetat im Kulturfiltrat zurückbleiben und hauptsächlich gegenüber *Gram*-negativen Bakterien wirksam sind, wurden von uns nicht weiter untersucht.

Die papierchromatographische Untersuchung des durch Extraktion mit Äthylacetat erhaltenen Basen-Gemisches zeigte zuerst, dass im wesentlichen drei antibiotisch wirksame Verbindungen vorliegen. Bei der präparativen Trennung durch Verteilung zwischen Chloroform und wässrigen Puffer-Lösungen gelang es, neben diesen drei Haupt-

¹⁾ 3. Mitt., Helv. **38**, 1445 (1955).

antibiotica – den Foromacidinen A, B und C – in kleiner Menge noch ein viertes Antibioticum – das Foromacidin D – abzutrennen.

Die durch Verteilung isolierten Foromacidine konnten durch Umlösen aus Äther-Petroläther als farblose, mikrokristalline Pulver erhalten werden, die sich sowohl in ihren physikalischen und chemischen als auch in den biologischen Eigenschaften sehr wenig unterscheiden. Die wichtigsten physikalischen Eigenschaften sind in Tab. 1 zusammengestellt. Aus dieser lässt sich entnehmen, dass die vier Foromacidine das gleiche Chromophor im UV. enthalten. Die Lage und die Höhe des Absorptionsmaximums im UV. spricht für die Anwesenheit eines konjugierten Dien-Systems²⁾. Von anderen Chromophoren käme unter Umständen noch eine α, β -ungesättigte Carbonyl-Gruppe in Frage. Die IR.-Absorptionsspektren der Foromacidine (vgl. Fig. 1) sind sehr ähnlich und unterscheiden sich wenig, aber deutlich im Fingerprint-Gebiet. Bei allen vier Verbindungen findet man eine breite Bande im 3μ -Gebiet, die auf Hydroxy-Gruppen, und eine starke Bande im 6μ -Gebiet, die auf ein oder mehrere Ester- oder Lacton-Carbonyl hinweist.

Tabelle 1.

Foromacidin	Smp.	$[\alpha]_D$	UV. λ_{\max} $m\mu$ ($\log \epsilon$)	IR. ν_{\max} cm^{-1}
A	134–138°	– 81° (MeOH)	231 (4,45)	3500; 1725
B	130–132°	– 83° (A.)	231 (4,43)	3500; 1733; 1245
C	124–128°	– 79° (A.)	231 (4,45)	3500; 1733; 1190
D	135–140°	– 75° (A.)	231 (4,44)	3500; 1725; 1245

Ebenso wie die physikalischen Eigenschaften sprechen auch die analytischen Daten für eine nahe Verwandtschaft der vier Foromacidine. Die durch elektrometrische Mikrotitration in 80-proz. Methylcellosolve³⁾ ermittelten Äquivalentgewichte liegen zwischen 452 und 478. Auf Grund der Methoxyl-Bestimmungen nach Zeisel muss man diese Zahlen verdoppeln, um zu minimalen Molekulargewichten zu gelangen, die demnach zwischen 904 und 956 ± 45 betragen dürften.

Tabelle 2.

Foromacidin	OCH ₃	NCH ₃	CCH ₃	akt. H	Hydrierung	pK _{MCS} [*] (Äqu.- Gew.)
A	1	4	$\cong 5$	6	4H ^{ab})	6,8 (458)
B	1	4	$\cong 6$	4–5	4H ^{ab})	6,8 (467)
C	1	4	$\cong 6$	4–5	4H ^{ab})	6,8 (478)
D				4	4H ^a)	6,8 (452)
a) Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit. b) Platinoxid-Katalysator in Eisessig.						

²⁾ Vgl. R. B. Woodward, J. Amer. chem. Soc. **64**, 72 (1942).

³⁾ Vgl. Helv. **37**, 1872 (1954); **38**, 508 (1955).

Die mit diesen Molekulargewichten berechneten Zahlen der analytisch ermittelten funktionellen Gruppen sind in Tab. 2 zusammengestellt. Man kann daraus entnehmen, dass die Foromacidine A, B und C (Foromacidin D wurde wegen Mangel an Material bisher nicht eingehender untersucht) je 2 basische Stickstoff-Atome, je 1 Methoxy-Gruppe, je 4 N-Methylgruppen und je zwei mit Palladium in Feinsprit

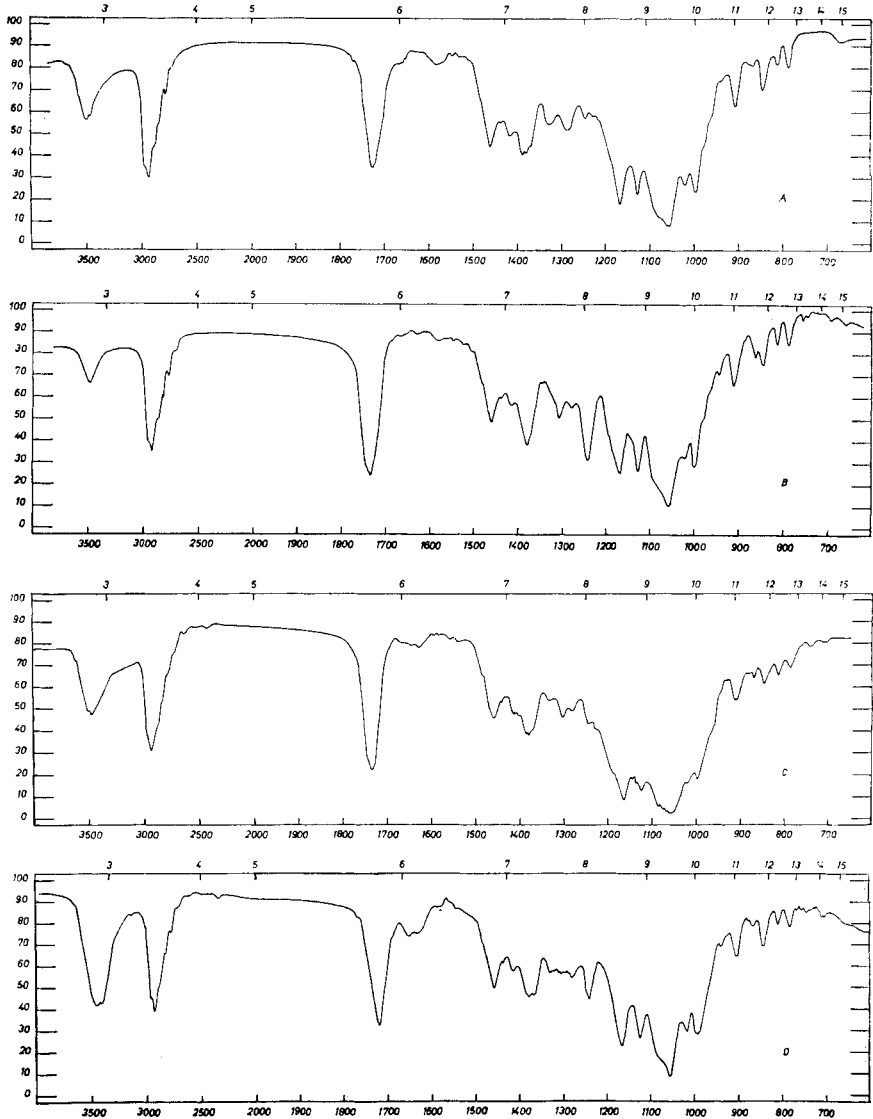


Fig. 1.

IR.-Absorptionsspektren in KBr: Foromacidine A, B, C und D.

hydrierbare Doppelbindungen besitzen. Durch Hydrierung mit Platin-oxyd-Katalysator in Eisessig lässt sich das Vorliegen einer zusätzlichen hydrierbaren Gruppierung nachweisen. Es ist weiter eine grössere Anzahl von C-Methyl-Gruppen nach *Kuhn-Roth* anwesend, die auf eine Verwandtschaft der Foromacidine mit der grossen Gruppe der Antibiotica, welcher z. B. Angolamycin, Carbomycine, Erythromycine, Methymycin, Narbomycin, Pikromycin u. a. m. angehören, hinweist.

Sehr wichtige Auskünfte über die Konstitution der Foromacidine A, B und C ergab die milde saure Hydrolyse. Es wurde dabei aus allen drei Antibiotica eine neutrale kristalline Verbindung $C_7H_{14}O_4$ vom Smp. 126,5–127,5⁰ erhalten, die mit der aus Carbomycin erhaltenen Mycarose⁴⁾ identisch ist. Dies folgt aus den Eigenschaften der isolierten Verbindung und konnte durch den Vergleich mit einem authentischen Vergleichspräparat bestätigt werden. Neben der Mycarose wurden bei der milden sauren Hydrolyse der Foromacidine A, B und C grössere Spaltstücke isoliert, die wir im folgenden Forocidine A, B und C nennen wollen. Die Forocidine lassen sich leicht papierchromatographisch sowohl von den entsprechenden Foromacidinen als auch untereinander unterscheiden. Bisher ist es gelungen, die Forocidine B und C kristallin zu erhalten, und deshalb wurden nur diese zwei eingehender untersucht. Ihre physikalischen Eigenschaften und die analytisch ermittelten funktionellen Gruppen sind in den Tab. 3 und 4 zusammengestellt. Man kann daraus ersehen, dass sich

Tabelle 3.

Forocidin	Smp.	$[\alpha]_D$	UV. λ_{max} m μ (log ϵ)	IR. ν_{max} cm ⁻¹
B	227—231 ⁰	– 6 ⁰ (A.)	232 (4,41)	3400; 1735; 1245
C	217,5 ⁰	– 7 ⁰ (A.)	232 (4,41)	3400; 1735; 1195

Tabelle 4.

Forocidin	OCH ₃	NCH ₃	CCH ₃	akt. H	Hydrierung	pK _{MCS} [*] (Äqu.-Gew.)
B	1	2	5	5	4H ^a)	7,5 (633)
C	1	2	5	5	4H ^a)	7,6 (665)

^a) Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit.

das Chromophor im UV. bei der Hydrolyse nicht wesentlich geändert hat, und auch die Banden im 3 μ - und 6 μ -Gebiet des IR.-Absorptionsspektrums (vgl. Fig. 2) blieben unverändert. Die Forocidine B und C enthalten weiter 1 Methoxy-Gruppe und die beiden mit Palla-

⁴) P. P. Regna, F. A. Hochstein, B. L. Wagner Jr. & R. B. Woodward, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4625 (1953).

dium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit hydrierbaren Doppelbindungen, wie die Foromacidine. Im Gegensatz zu den Foromacidinen liegt darin nur ein basischer Stickstoff in Form einer Dimethylamino-Gruppe vor. Man kann daraus und aus den Änderungen im Äquivalentgewicht schliessen, dass bei der Entstehung der Forocidine neben Mycarose noch ein Mol eines Dimethylaminozuckers abgespalten wurde. Dieser konnte zwar im Hydrolysat papierchromatographisch nachgewiesen werden, wurde jedoch bisher nicht isoliert. Es handelt sich nach papierchromatographischen Eigenschaften um eine mit Desosamin aus Erythromycin⁵⁾, Pikromycin⁶⁾, Narbomycin⁷⁾, Methymycin⁸⁾ oder Mycaminose aus Carbomycin⁹⁾ verwandte, aber nicht identische Verbindung.

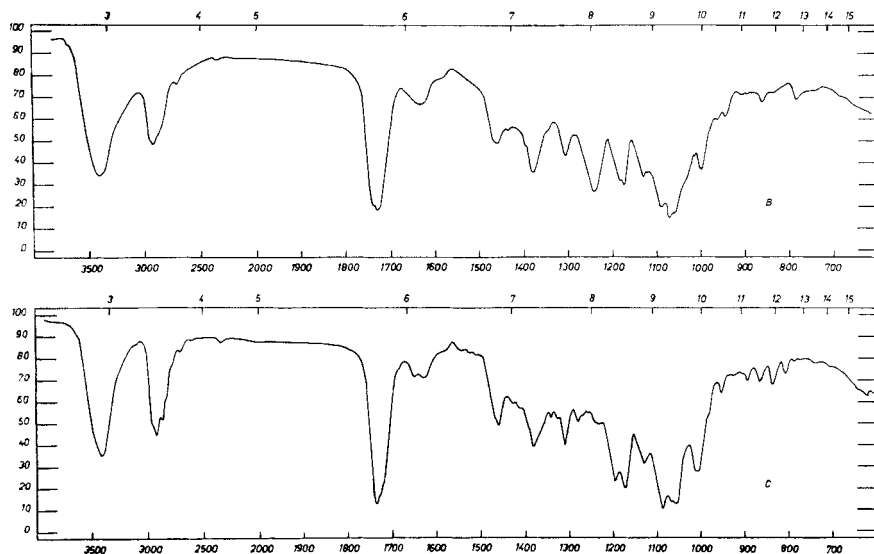


Fig. 2.

IR.-Absorptionsspektren in KBr: Forocidine B und C.

Man wird wahrscheinlich nicht fehlgehen, wenn man annimmt, dass auch die Dimethylamino-Gruppe in den Forocidinen einem zweiten Dimethylamino-zucker-Rest angehört. Die Versuche, diesen durch energischere saure Hydrolyse abzuspalten, führten nicht zu einem eindeutigen Ergebnis, weil die Forocidine unter den bisher angewandten Reaktionsbedingungen nur dunkle, harzige Produkte lieferten.

⁵⁾ E. H. Flynn, M. V. Sigal, P. F. Wiley & K. Gerzon, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3121 (1954).

⁶⁾ H. Brockmann, H. König & R. Oster, Chem. Ber. **87**, 856 (1954).

⁷⁾ R. Corbaz, L. Ettliger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, E. Kyburz, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser & H. Zähler, Helv. **38**, 935 (1955).

⁸⁾ C. Djerassi, A. Bowers, R. Hodges & B. Riniker, J. Amer. chem. Soc. (im Druck).

⁹⁾ F. A. Hochstein & K. Murai, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5080 (1954); F. A. Hochstein & P. P. Regna, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3353 (1955).

Weitere wertvolle Auskünfte über die Foromacidine liessen sich durch alkalische Hydrolyse erhalten. Neben Dimethylamin, dessen Bildung einen weiteren Hinweis auf die Anwesenheit von β -Dimethylamino-zuckern darstellt, konnten aus dem Hydrolysat flüchtige Säuren erhalten werden, und zwar aus Foromacidin A etwa 0,4 Mol, und aus den Foromacidinen B und C etwa 1,3 Mol. Durch papierchromatographische Untersuchung dieser Säuren wurde gefunden, dass im Falle von Foromacidin A Ameisensäure vorliegt, im Falle von Foromacidin B ein Gemisch von wenig Ameisensäure mit viel Essigsäure und im Falle von Foromacidin C wenig Ameisensäure und viel Propionsäure. Die Essigsäure aus Foromacidin B und die Propionsäure aus Foromacidin C konnten auch als kristalline p-Phenylphenacylester in Substanz isoliert werden¹⁰). Bei der alkalischen Verseifung von Forocidinen B und C konnte ebenfalls etwa 1 Mol mit Wasserdampf flüchtige Säuren erhalten werden, die papierchromatographisch als Essigsäure bzw. Propionsäure identifiziert wurde. Wir nehmen an, dass es sich bei Foromacidin C und Forocidin C um Propionsäureester, bei Foromacidin B und Forocidin B um Essigsäureester handelt, während das entsprechende Hydroxyl in Foromacidin A nicht verestert ist. Die in schlechter Ausbeute erfasste Ameisensäure scheint nicht durch Verseifung einer Ester-Gruppe, sondern durch tiefergehende Abbaureaktionen zu entstehen.

Für das Vorliegen einer Acetyl- bzw. einer Propionyl-Gruppe in den Foromacidinen B und C sowie in den entsprechenden Forocidinen sprechen u. a. auch die IR.-Absorptionsspektren dieser Verbindungen. In Foromacidin B und Forocidin B findet man eine für Acetyl-Derivate typische Bande bei 1245 cm^{-1} , während sich bei Foromacidin C und Forocidin C eine für Propionyl-Derivate typische Bande bei 1190 cm^{-1} feststellen lässt^{10a}).

Auf das Fehlen eines entsprechenden Säure-Restes im Foromacidin A weist auch die Bestimmung der C-Methyle nach *Kuhn-Roth* hin, bei der eine C-Methyl-Gruppe weniger gefunden wird als bei den Foromacidinen B und C.

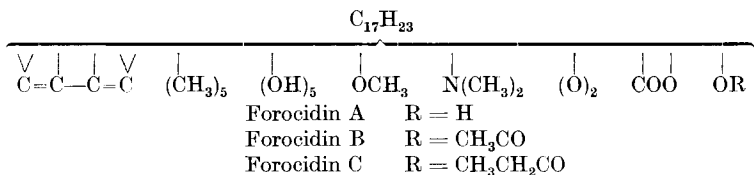
Es sei bei dieser Gelegenheit an ein anderes Paar von Antibiotica – Thiolutin und Aureothricin¹¹) – erinnert, von welchen das erste ein Acetyl- und das zweite ein Propionyl-Derivat desselben Grundkörpers darstellt.

Diskussion der Ergebnisse.

Auf Grund der analytischen Daten lässt sich mit Vorbehalt für das Forocidin B die Formel $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{O}_{12}\text{N}$ und für das Forocidin C die Formel $\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{O}_{12}\text{N}$ ableiten, welche man folgendermassen weiter aufgliedern kann:

¹⁰) *A. Hunger & T. Reichstein, Helv. 33, 90 (1950).*

^{10a}) Vgl. *L. J. Bellamy, The Infra-red Spectra of Complex Molecules, Methuen & Wiley, London & New York 1954, S. 161, 163.*



Es ist vielleicht nicht uninteressant zu erwähnen, dass man von den Forocidinen B und C durch eine, vorläufig nur gedachte, hydrolytische Abspaltung der Säure-Reste und der Methoxy-Gruppe sowie eines Dimethylamino-zuckers $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}$ vom Typus der Mycaminose zu einem Grundkörper $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_8$ gelangt, dessen Formel einem Dehydroerythronolid entspricht. Das Erythronolid selbst, das kürzlich als ein 14gliedriges, einfach ungesättigtes Hexahydroxy-lacton erkannt wurde¹²⁾, ist der Grundkörper des Erythromycins. Ähnliche vielgliedrige Lactone scheinen in anderen verwandten Antibiotica wie Carbomycin, Pikromycin, Methymycin und Narbomycin vorzuliegen.

Schwieriger ist es, Formeln für die Foromacidine selbst eindeutig abzuleiten. Die analytischen Ergebnisse stehen im Einklang mit folgenden Formeln: Foromacidin A $\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{O}_{15}\text{N}_2$, Foromacidin B $\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{16}\text{N}_2$ und Foromacidin C $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{16}\text{N}_2$. Für Foromacidin D möchten wir, da es noch zu wenig untersucht wurde, keine Formel vorschlagen.

Die Forocidine würden nach diesen Formeln aus den Foromacidinen schematisch durch hydrolytische Abspaltung einer Molekel Mycarose $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4$ und einer Molekel eines Dimethylamino-zuckers $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$, unter Anlagerung noch einer weiteren Molekel Wasser, entstehen.

Von den 16 Sauerstoff-Atomen der Foromacidine B und C würden 4–5 als freie Hydroxyle, 1 als Methoxyl, 2 in einem Säure-Rest, 2 in einer Lacton-Gruppe und 6 als Acetal-Sauerstoffe vorliegen. Foromacidin A, in welchem der Säure-Rest fehlt, würde 1 freies Hydroxyl mehr enthalten.

Es sei hervorgehoben, dass die vorgeschlagenen Formeln der Foromacidine und der Forocidine nicht als endgültig anzusehen sind, solange es nicht gelungen ist, alle Spaltstücke zu erfassen. Es wäre möglich, dass sie vor allem in der Anzahl der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Atome kleine Korrekturen erfahren.

Biologische Aktivität.

Die biologische Aktivität der Foromacidine A, B und C ist sehr ähnlich. Sie sind hoch wirksam *in vitro* gegenüber *Gram*-positiven Bakterien (vgl. Tab. 5). Die Wirksamkeit von Foromacidin D ist durchschnittlich eine Zehnerpotenz geringer.

Foromacidin A, B und C besitzen auch eine gewisse Aktivität gegenüber *Gram*-negativen Bakterien; so werden *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Typ A), *Pasteurella pestis* und *Vibrio comma* (El Tor) durch 1 mg/ml gehemmt. Unempfindlich ge-

¹¹⁾ Vgl. W. D. Celmer & I. A. Solomons, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2861 (1955).

¹²⁾ P. F. Wiley, K. Gerzon, E. H. Flynn, M. V. Sigal, Jr. & U. C. Quarck, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3677 (1955).

genüber 1 mg/ml zeigten sich *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv), *Candida tropicalis* und *Candida albicans*.

Tabelle 5.

Testorganismen ¹³⁾	Hemmende Konzentration µg/ml ¹³⁾		
	A	B	C
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0,1	0,1
<i>Streptococcus faecalis</i>	1	1	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	10	1	0,1
<i>Bacillus megatherium</i>	0,1	10	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	1	1
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	10	10	10

Die Foromacidine besitzen ebenfalls eine hohe Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien in vivo. An mit *Streptococcus pyogenes* infizierten Mäusen wurden bei subcutaner Applikation mit 5×10 mg/kg 100% überlebende, und mit 1×5 mg/kg oder 5×1 mg/kg 50% überlebende Tiere beobachtet. Auch mit peroraler Verabreichung liess sich ein vollständiger Schutz erreichen. Daneben erwiesen sich die Foromacidine als wirksam in vivo gegenüber Staphylococcen, Pneumococcen, Pasteurellen (Gram-negativ), Spirochaeten (*Borrelia recurrentis*), Amöben (*Entamoeba histolytica*) und Malariaerregern (*Plasmodium berghei*).

Die akute Toxizität ist gering. Von der Maus werden 500 mg/kg s.c. oder 250 mg/kg i.v. ohne Schädigung ertragen. Penicillin-resistente Mikroorganismen sind Foromacidin-empfindlich. Dagegen weisen Foromacidine mit Pikromycin eine partiell gekreuzte Resistenz auf; d. h. ein auf Resistenz gegen Pikromycin gezüchteter Stamm *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* wird zwar nicht unempfindlich gegenüber Foromacidinen, wohl aber deutlich weniger empfindlich als der Ausgangsstamm^{13a)}.

Als unsere Untersuchungen fast abgeschlossen waren, fanden wir, dass die von uns isolierten Streptomyceten-Stämme, welche Foromacidine produzieren, in ihren Eigenschaften Ähnlichkeiten aufweisen mit dem inzwischen von *S. Pinnert-Sindico*¹⁴⁾ beschriebenen *Streptomyces ambofaciens*. Der im experimentellen Teil durchgeführte Vergleich ihrer Angaben mit unseren Befunden zeigt, dass unsere Stämme mit ihrem verwandt sind.

Streptomyces ambofaciens *Pinnert-Sindico* produziert nach den inzwischen bekannt gewordenen Literaturangaben die Antibiotica Con-

¹³⁾ Vgl. Helv. **38**, 935 (1955).

^{13a)} Über die biologische Wirkung der Foromacidine wird an einer anderen Stelle ausführlicher berichtet.

¹⁴⁾ *S. Pinnert-Sindico*, Annales Institut Pasteur **87**, 702 (1954).

gocidin¹⁵) und Spiramycine. Die aus den Laboratorien der *Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc* stammenden vorläufigen Angaben über die Spiramycine¹⁶) wiesen darauf hin, dass diese mit den Foromacidinen nahe verwandt bzw. identisch sein könnten. Durch Vermittlung von Professor *R. Paul* erhielten wir unlängst authentische Muster der Spiramycine I, II und III und konnten feststellen, dass sie mit den Foromacidinen A, B und C in der angegebenen Reihenfolge identisch sind. Herrn Prof. *R. Paul* möchten wir für die Bekanntgabe verschiedener analytischer Daten über die Spiramycine und besonders auch der Isolierung der Mycarose bei der sauren Hydrolyse bestens danken.

Den Herren Dr. *P. Reusser* und Dr. *A. Stalder* danken wir für die Bereitung von grösseren Mengen des Ausgangsmaterials; Hr. Prof. *H. H. Günthard* für die IR.-Absorptionsspektren; Hr. *W. Simon* für die elektrometrischen Titrationen; Hr. *E. Herzog* für die Mithilfe bei quantitativen Verseifungsversuchen.

Experimenteller Teil.

Beschreibung der Organismen.

Stamm ETH. 8703 wurde aus einer Bodenprobe vom Forum Romanum, Rom. Stamm ETH. 9427 aus einer Bodenprobe von Iseo im Malcantone, Kanton Tessin, isoliert.

Die beiden isolierten Stämme werden im folgenden beschrieben:

Luftmycel sammetig, anfänglich weiss, später aschgrau. Spiralen bei ETH. 8703 selten, bei ETH. 9427 häufig. Sporen glatt.

*Synthetischer Agar*¹⁷⁾: Substratmycel schleierartig, gelbgrau nach 3 Tagen, rötlich-braun nach 7 Tagen; Luftmycel sammetig, grauweiss nach 3 Tagen, aschgrau mit helleren Tupfen nach 13 Tagen bei ETH. 8703, gleichmässig aschgrau nach 13 Tagen bei ETH. 9427. Lösliches Pigment fehlend bei ETH. 8703, schwach rötlichgrau bei ETH. 9427.

Synthetische Lösung: Sediment und Flocken, milchweiss; kein Pigment. Dazu bei ETH. 9427 Pellikel nach 24 Tagen, mit weissem Luftmycel.

Glucose-Agar: Wachstum runzlig, goldgelb nach 3 Tagen, hellbraun nach 7 Tagen; Luftmycel sammetig, milchweiss nach 3 Tagen, aschgrau nach 7 Tagen; kein Pigment.

Glucose-Asparagin-Agar: Substratmycel dünn, schleierartig, weissgrau nach 3 Tagen, grünlichgrau nach 7 Tagen; Luftmycel sammetig, grünlichgrau nach 3 Tagen, bei ETH. 8703 aschgrau mit einem Stich ins Grüne und mit weisslichen Tupfen nach 7 Tagen, bei ETH. 9427 einheitlich lauchgrün nach 7 Tagen; kein Pigment.

Calciummalat-Agar: Substratmycel dünn, schleierartig, bei ETH. 8703 weisslichgrau und gelb, bei ETH. 9427 rötlichgelb bis rötlichgrau; Luftmycel weissgrau nach 3 Tagen, bei ETH. 8703 aschgrau nach 7 Tagen, bei ETH. 9427 stellenweise blaugrün nach 7 Tagen; Substrat bei ETH. 8703 nicht gefärbt, bei ETH. 9427 gelbrot.

Gelatinestich (18⁹): Pellikel bei ETH. 8703 erst hellbraun, dann bleigrau, bei ETH. 9427 erst weissgrau, dann rosa; Luftmycel staubig, bei ETH. 8703 kreideweiss, bei ETH. 9427 weissgrau bis aschgrau; Verflüssigung langsam, nach 16 Tagen beginnend, nach 36 Tagen bei ETH. 8703 0,7–1 cm, bei ETH. 9427 1–1,2 cm; kein Pigment.

Stärkeplatte: Wachstum dünn, bei ETH. 8703 rötlichgrau, bei ETH. 9427 braun; Luftmycel sammetig, bei ETH. 8703 gleichmässig aschgrau, bei ETH. 9427 aschgrau mit weissen Tupfen; Hydrolysierung schwach: 0,3 cm nach 4 Tagen.

¹⁵) *R. Despois & L. Ninet*, VI. Congr. Intern. Microbiol. (Roma), Riassunti delle Comun. **1**, 241 (1953).

¹⁶) *S. Pinnert-Sindico, L. Ninet, J. Preud'homme & C. Cosar*, Antibiotics Annual **1954**—55, 724.

¹⁷) Rezepte und Terminologie wie in Helv. **38**, 938 (1955).

Kartoffeln: Wachstum flechtenartig, bei ETH. 8703 gelblichweiss, bei ETH. 9427 erst sattgelb, nach 10 Tagen rotgelb; Luftmycel mehlig bestäubt, weissgrau bis aschgrau; kein Pigment.

Karotten: Wachstum dünn, hellgelb; Luftmycel sammetig, erst weissgrau, dann bei ETH. 8703 aschgrau, bei ETH. 9427 grüngrau; kein Pigment.

Lackmusmilch (28°): Pellikel, erst ohne, dann mit aschgrauem Luftmycel; Peptonisierung und Gerinnung nach 7 Tagen; Lackmus bei ETH. 8703 rötlich, bei ETH. 9427 blau.

Von allen bisher beschriebenen Arten sind unsere beiden Isolierungen am ähnlichsten dem *Streptomyces ambofaciens* Pinnert-Sindico¹⁴). Unsere Befunde ergeben vorläufig folgende Unterschiede:

	<i>S. ambofaciens</i> ¹⁴)	ETH. 8703	ETH. 9427
Gelatinestich . .	Pigment orangebraun	kein Pigment	kein Pigment
Lackmusmilch . .	unvollständige Peptonisierung in 1 Monat, ohne Coagulation	vollständige Peptonisierung in 7 Tagen, mit Coagulation	vollständige Peptonisierung in 7 Tagen, mit Coagulation

Die Benützung verschiedener Kohlenstoffquellen ist in Tab. 6 angegeben.

Tabelle 6.

Kohlenstoffquelle ¹⁸⁾	<i>S. ambofaciens</i> ¹⁴)	ETH. 8703	ETH. 9427
L-Xylose	±	+	+
L-Arabinose . . .	+	+	+
L-Rhamnose . . .	+	+	+
D-Fructose . . .	+	+	+
D-Galaktose . . .	+	+	+
Saccharose . . .	±	-	(-)
Maltose	±	+	+
Lactose	+	+	+
Raffinose	-	-	-
Inulin	+	+
D-Mannit	+	+	+
D-Sorbit	-	(-)	-
Dulcit	-	-	-
Mesoinosit . . .	±	(+)	+
Salicin	+	+
Natriumacetat	(-)	(+)
Natriumcitrat	(-)	(+)
Natriumsuccinat .	..	(-)	(+)

- + = gutes Wachstum, sichere Verwendung der betreffenden C-Quelle.
- ± { (+) = schwaches Wachstum, Verwendung der betreffenden C-Quelle fraglich.
- { (-) = sehr schwaches Wachstum, Verwendung unwahrscheinlich.
- = kein Wachstum, keine Verwendung.
- .. = keine Angabe.

¹⁸⁾ Methodik nach T. G. Pridham & D. Gottlieb, J. Bacteriology 56, 107 (1948).

Züchtung.

Für die Produktion der Foromacidine wurden die Stämme ETH. 8703 oder ETH. 9427 bei 27° auf einer Schlempe-Nährlösung von folgender Zusammensetzung gezüchtet: 10 g Trockenschlempe, 10 g Rohglucose, 5 g Natriumchlorid, 1 g Natriumnitrat, 10 g Calciumcarbonat, 1 l Leitungswasser. Das pH wurde auf 7,5 eingestellt. Sterilisiert wurde 20–30 Min. bei 1 atü. Die Methodik der Schüttel- und Gärtankkulturen war gleich wie in früheren Mitteilungen¹⁹⁾, ebenso die Testmethoden.

Isolierung der Foromacidine A, B, C und D.

Nach Erreichung der optimalen Aktivität, im allgemeinen nach 48 Std., wurde die Kulturflüssigkeit unter Zusatz von Filterhilfsmitteln in mit Nylontüchern bespannten Filterpressen vom Mycel und anderen festen Bestandteilen befreit. Hierauf wurde das Kulturfiltrat auf pH 8,5 eingestellt und mit Äthylacetat in einem mehrstufigen Extraktionsapparat (Westfalia oder Luwesta) ausgezogen.

15 l eines solchen Extraktes (aus 50 l Kulturfiltrat) wurden in 3 Portionen mit total 7 l 0,5-n. Essigsäure ausgezogen, diese mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung alkalisch gemacht und mit dreimal 1 l Essigester geschüttelt. Die vereinigten Essigester-Auszüge wurden erneut mit verd. Essigsäure behandelt und die Basen nach dem Neutralisieren schliesslich in 600 cm³ Essigester aufgenommen. Der gewaschene und getrocknete Extrakt wurde im Vakuum eingedampft, wobei ein gelber Schaum erhalten wurde. Dieser enthielt die gesamte Aktivität des ursprünglichen Extraktes.

Papierchromatographie. Filterpapier *Whatman* Nr. 1 wird mit einer 2-proz. wässrigen Lösung von Natrium-m-kresotinat²⁰⁾ getränkt und zwischen Filterpapier abgetupft. Auf das noch feuchte Papier werden die Proben in einer Menge von ca. 100 γ aufgetragen und nach der Rundfiltermethode²¹⁾ mit einem Gemisch von 1 Teil Dibutyläther und 3 Teilen Butylacetat, gesättigt mit der Natrium-m-kresotinat-Lösung, entwickelt. Nach einer Laufzeit von 2–3 Std. wird im Trockenschrank bei 100° 2–3 Min. getrocknet, das Papierchromatogramm mit 15-proz. Phosphorsäure besprüht und wieder bei 100° bis zum Auftreten der blaugrünen Färbung der Ringe erhitzt. Die Ringe sind noch besser sichtbar im UV.-Licht, in dem sie eine orangefarbige Fluoreszenz zeigen. Die rohen Basen geben nach dieser Methode drei gut voneinander getrennte Ringe. Die entsprechenden Verbindungen wurden von uns in der Reihenfolge der zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit Foromacidin A, B und C benannt.

Craig-Verteilung. Als ein günstiges Lösungsmittelsystem für die *Craig*-Verteilung erwies sich ein Gemisch aus gleichen Volumteilen Chloroform und einer 0,2-m. Citrat-Pufferlösung pH 4,9. 11,6 g durch Extraktion mit Äthylacetat erhaltene rohe Basen wurden mit diesem Lösungsmittelsystem zuerst über 145 Stufen verteilt. Die Prüfung der einzelnen Fraktionen auf biologische Wirksamkeit zeigte drei Aktivitätsmaxima bei Fraktionen 26, 48 und 88. Aus den Fraktionen 71–115 wurden 4,8 g rohes Foromacidin A gewonnen, die Fraktionen 39–70 lieferten 2,4 g rohes Foromacidin B und die Stufen 16–38 2,7 g eines Gemisches von viel Foromacidin C und wenig Foromacidin D.

Zur Trennung von Foromacidin C und D wurden 15,0 g des letzterwähnten Gemisches über 290 Stufen zwischen Chloroform und einer 1-m. Acetat-Pufferlösung pH 4,5 verteilt. Man erhielt aus den Fraktionen 130–140 5,6 g reines Foromacidin C, die Fraktionen 115–129 sowie 141–150 ergaben weitere 5,2 g derselben Verbindung, die etwas weniger rein war. Aus den Fraktionen 55–90 wurden 0,78 g des Foromacidins D isoliert.

Die isolierten Substanzen und ihr Abbau.

Foromacidin A. 4,8 g rohes Foromacidin A wurden mit dem gleichen Lösungsmittelsystem, welches für die Isolierung verwendet worden war, nochmals über 112 Stufen verteilt. Das in den Fraktionen 55–88 vorliegende reine Foromacidin A (4,15 g) löste man

¹⁹⁾ Vgl. *Helv.* **38**, 940 (1955).

²⁰⁾ Vgl. *H. Brockmann & H. Gröne*, *Chem. Ber.* **87**, 1050 (1954).

²¹⁾ Ausführung nach *J. Carles*, *Bull. Soc. chim. biol.* **37**, 521 (1955).

aus Äther-Petroläther um, wodurch es als farbloses Pulver vom Smp. 134–138° erhalten wurde. Zur Analyse wurde mehrmals aus Äther-Petroläther umgefällt und 48 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D = -81^\circ$ ($c = 0,34$, Methanol); -56° ($c = 0,52$, Chloroform). pK_{MCS}^* 6,8, Äquivalentgewicht 458.

$C_{45}H_{78}O_{15}N_2$ Ber. C 60,93 H 8,86 N 3,16 OCH_3 3,50
(M.G. 887,09) 4(N)CH₃ 6,78 5(C)CH₃ 8,48 6 akt. H 0,68%
Gef. C 60,72; 60,37 H 9,32; 9,01 N 3,22; 3,14
 OCH_3 3,78 (N)CH₃ 6,28 (C)CH₃ 8,18; 8,08 akt. H 0,68%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: $\lambda_{max} = 231 m\mu$, $\log \epsilon = 4,45$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 1. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,17; Platinoxid-Katalysator in Eisessig 2,94.

Foromacidin B. 4,5 g rohes Foromacidin B wurden über 242 Stufen zwischen Chloroform und 1-m. Acetat-Pufferlösung pH 4,55 verteilt. Aus den Fraktionen 121–130° wurden 2,3 g reines Foromacidin B erhalten, das nach mehrmaligem Umfällen aus Äther-Petroläther bei 130–132° schmolz. Die Fraktionen 115–120 sowie 131–150 lieferten weitere 1,6 g nahezu reines Foromacidin B, während in den Fraktionen 80–95 noch 0,25 g Foromacidin C gefunden wurden. Zur Analyse wurde 48 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D = -83^\circ$ ($c = 0,82$, Feinsprit); -61° ($c = 0,93$, Chloroform). pK_{MCS}^* 6,8; Äquivalentgewicht 462, 472.

$C_{47}H_{80}O_{16}N_2$ Ber. C 60,75 H 8,88 N 3,02 OCH_3 3,34
(M.G. 929,13) 4(N)CH₃ 6,77 6(C)CH₃ 9,71 5 akt. H 0,54%
Gef. C 60,38; 60,60 H 8,99; 8,76 N 2,97; 3,24
 OCH_3 3,69 (N)CH₃ 6,64 (C)CH₃ 8,48 akt. H 0,54%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: $\lambda_{max} = 231 m\mu$, $\log \epsilon = 4,43$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 1. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,01; Platinoxid-Katalysator in Eisessig 3,24.

Foromacidin C. Das durch zweimalige Verteilung isolierte Foromacidin C wurde mehrmals aus Äther-Petroläther umgelöst, wonach es ein farbloses Pulver vom Smp. 124–128° bildete. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° 48 Std. getrocknet. $[\alpha]_D = -79^\circ$ ($c = 1,19$, Feinsprit); -62° ($c = 0,90$, Chloroform). pK_{MCS}^* 6,8; Äquivalentgewicht 478.

$C_{48}H_{82}O_{16}N_2$ Ber. C 61,12 H 8,76 N 2,97 OCH_3 3,29
(M.G. 943,15) 4(N)CH₃ 6,38 6(C)CH₃ 9,56 4 akt. H 0,42 5 akt. H 0,53%
Gef. C 60,83; 61,18 H 8,96; 8,66 N 2,96; 2,86
 OCH_3 3,62 (N)CH₃ 6,34 (C)CH₃ 8,96 akt. H 0,46%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: $\lambda_{max} = 231 m\mu$, $\log \epsilon = 4,45$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 1. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,03; Platinoxid-Katalysator in Eisessig 3,00.

Foromacidin D. Das durch Verteilung abgetrennte Foromacidin D bildete nach mehrmaligem Umlösen aus Äther-Petroläther ein farbloses Pulver vom Smp. 135–140°. Zur Analyse wurde 48 Std. bei 80° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D = -75^\circ$ ($c = 0,81$, Feinsprit). pK_{MCS}^* 6,8, Äquivalentgewicht 452.

Gef. C 59,85 H 8,48 N 3,35%

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit $\lambda_{max} = 231 m\mu$, $\log \epsilon = 4,44$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 1. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,08.

Saure Hydrolyse der Foromacidine A, B und C. Mycarose und Dimethylamino-zucker. 1 Gewichtsteil Foromacidin liess man mit 50 Volumenteilen 0,75-n. Salzsäure 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Das Reaktionsgemisch wurde darauf mit einem geringen Überschuss Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit Chloroform die Forocidine (siehe unten) ausgeschüttelt.

Die wässrige Schicht wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand dreimal mit Benzol ausgekocht. Der Rückstand nach dem Verdampfen des Benzols, welcher die Zucker enthielt, wurde auf Filterpapier *Whatman* Nr. 1 papierchromatographisch nach der absteigenden Methode untersucht. Es wurden Proben von 50–100 γ aufgetragen; zur Entwicklung diente das mit Wasser gesättigte Gemisch von 100 cm³ Butanol und 10 cm³ Eisessig. Als Vergleichsverbindungen wurden Desosamin aus Narbomycin und Mycarose aus Carbomycin verwendet und die R-Werte auf den des ersteren bezogen. Die Flecken wurden durch Besprühen mit einer 0,05-n. ammoniakalischen Silbernitrat-Lösung und Erhitzen auf 100° sichtbar gemacht. Alle drei Foromacidine ergaben zwei typische Flecken, von welchen der erste mit R_D 1,70 dem Dimethylamino-zucker, und der zweite mit R_D 5,1 der Mycarose entsprach.

Die Mycarose konnte aus dem Rückstand des Benzol-Auszuges durch Kristallisation aus Aceton rein erhalten werden. Sie bildete nach Sublimation im Hochvakuum bei 103° farblose Kristalle vom Smp. 126,5–127,5°, die mit authentischer Mycarose aus Carbomycin keine Smp.-Erniedrigung gaben. $[\alpha]_D = -30^\circ$ ($c = 1,12$, Wasser).

$C_7H_{14}O_4$	Ber. C 51,84	H 8,70	(C)CH ₃ 18,54	akt. H 1,86%
	Gef. „ 51,72	„ 8,63	„ 16,24	„ 1,73%

Die Identität des isolierten Zuckers mit der Mycarose konnte auch durch IR.-Absorptionsspektren bestätigt werden.

Forocidin B. Aus 800 mg Foromacidin B wurden durch saure Hydrolyse und Ausziehen des Reaktionsgemisches mit Chloroform 505 mg basische Anteile erhalten, die aus Aceton-Äther in farblosen Plättchen vom Smp. 227–231° kristallisierten. Zur Analyse wurde 48 Std. im Hochvakuum bei 80° getrocknet. $[\alpha]_D = -6^\circ$ ($c = 0,65$, Feinsprit). pK_{MCS}^* 7,5, Äquivalentgewicht 633.

$C_{32}H_{55}O_{12}N$	Ber. C 59,51	H 8,59	N 2,17	OCH ₃ 4,80
(M.G. 645,8)	2N(CH ₃) 4,66	5(C)CH ₃ 11,64	5 akt. H 0,78%	
	Gef. C 59,50	H 8,70	N 2,22	OCH ₃ 5,03
	(N)CH ₃ 4,03	(C)CH ₃ 9,61	akt. H 0,70%	

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit $\lambda_{max} = 232$, $\log \epsilon = 4,41$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 2. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,08.

Forocidin C. 400 mg Foromacidin C lieferten bei der sauren Hydrolyse 250 mg mit Chloroform ausziehbare Basen. Diese kristallisierten nach Befeuchten mit Äther in feinen Nadeln, welche nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 217,5° schmolzen. $[\alpha]_D = -7^\circ$ ($c = 1,62$, Feinsprit). pK_{MCS}^* 7,6, Äquivalentgewicht 665.

$C_{33}H_{57}O_{12}N$	Ber. C 60,07	H 8,71	N 2,12	OCH ₃ 4,73
(M.G. 659,79)	2(N)CH ₃ 4,56	5(C)CH ₃ 11,39	5 akt. H 0,76%	
	Gef. C 60,40	H 8,68	N 2,25	OCH ₃ 5,12
	(N)CH ₃ 4,52	(C)CH ₃ 9,61	akt. H 0,73%	

UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit $\lambda_{max} = 232$, $\log \epsilon = 4,41$. IR.-Absorptionsspektrum in KBr Fig. 2. Doppelbindungszahl: Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator in Feinsprit 2,22.

Alkalische Hydrolyse von Foromacidin A, B und C und von Forocidin B und C. Die flüchtigen Säuren, die bei der alkalischen Hydrolyse der Foromacidine und Forocidine entstehen, wurden zuerst nach dem Verfahren von *F. Wiesberger*²³⁾ quantitativ bestimmt und dann papierchromatographisch²⁴⁾ auf qualitative Zusammensetzung untersucht. Es wurden dabei folgende Ergebnisse erhalten: Foromacidin A 0,4 Mol Ameisensäure, Foromacidin B 1,3 Mol Ameisensäure und Essigsäure, Foromacidin C 1,3 Mol Ameisensäure und Propionsäure, Forocidin B 1,1 Mol Essigsäure, Forocidin C 1,2 Mol Propionsäure.

²³⁾ Mikrochemie **33**, 51 (1948).

²⁴⁾ *A. R. Jones, E. J. Dowling & W. J. Skraba*, Anal. Chemistry **25**, 394 (1953).

Foromacidin B und C wurden dann genau nach der Vorschrift von *A. Hunger & T. Reichstein*¹⁰⁾ mit methanolischer Kalilauge verseift und die mit Wasserdampf flüchtigen Säuren in die p-Phenyl-phenacyl-ester übergeführt.

Aus 310 mg Foromacidin B erhielt man 59 mg eines p-Phenyl-phenacyl-esters, der nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther bei 110,5–111,5° schmolz. Dieser gab keine Smp.-Erniedrigung mit einem authentischen p-Phenyl-phenacyl-acetat²⁵⁾ und besitzt ein mit diesem identisches IR.-Absorptionsspektrum.

350 mg Foromacidin C lieferten 71 mg eines p-Phenyl-phenacyl-esters, der aus Äther-Petroläther umkristallisiert wurde. Der Smp. 101–101,5° wurde nicht geändert durch Mischen mit einem authentischen p-Phenyl-phenacyl-propionat vom Smp. 101,5–102°²⁵⁾; mit p-Phenyl-phenacyl-acetat vom Smp. 110,5–111,5° wurde der Misch-Smp. 90–95° beobachtet. Die IR.-Absorptionsspektren des durch Hydrolyse aus Foromacidin C gewonnenen und des authentischen p-Phenyl-phenacyl-propionates waren identisch.

Farbreaktionen der Foromacidine A, B und C. Die Foromacidine A, B und C geben die gleiche Farbreaktion auf Erythromycin nach *Fischbach & Levine*²⁶⁾ wie das Erythromycin. Die Farbreaktion auf Carbomyein nach *Fischbach & Levine*²⁶⁾ verläuft mit den Foromacidinen A, B und C ebenfalls ähnlich wie mit Carbomyein, die Farbtöne sind jedoch etwas weniger intensiv und rein. Die beiden Reaktionen sind somit nicht spezifisch für Erythromycin bzw. Carbomyein.

Die Mikroanalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

Zusammenfassung.

Aus dem Kulturfiltrat von zwei Streptomyceten, welche *Streptomyces ambofaciens Pinnert-Sindico* nahestehen, wurden 4 lipophile, basische Antibiotica – die Foromacidine A, B, C und D – isoliert.

Die Foromacidine A, B und C liefern durch milde saure Hydrolyse Mycarose, einen Dimethylamino-zucker und Forocidin A, B bzw. C. Durch alkalische Hydrolyse wird aus Foromacidin B und Forocidin B 1 Mol Essigsäure, und aus Foromacidin C und Forocidin C 1 Mol Propionsäure abgespalten.

Die Zusammensetzung und die analytisch nachgewiesenen funktionellen Gruppen deuten auf eine Verwandtschaft der Foromacidine mit den Antibiotica der Carbomyein-Erythromycin-Gruppe hin.

Die Foromacidine zeichnen sich durch bemerkenswerte antibiotische Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* aus und besitzen eine geringe Toxizität.

Forschungslaboratorium der *CIBA-Aktiengesellschaft*,
Pharmazeutische Abteilung, Basel.
Institut für spezielle Botanik
und Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

²⁵⁾ Vgl. *N. L. Drake & J. Bronitsky*, *J. Amer. chem. Soc.* **52**, 3715 (1930).

²⁶⁾ *H. Fischbach & J. Levine*, *Antibiotics and Chemotherapy* **3**, 1159 (1953),