

## 163. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

37. Mitteilung<sup>1)</sup>)

## Acumycin

von H. Bickel, E. Gäumann, R. Hütter, W. Sackmann, E. Vischer,  
W. Voser, A. Wettstein und H. Zähler

(10. V. 62)

Unter den Stoffwechselprodukten eines Actinomyceten der Spezies *Streptomyces griseoflavus* (KRAINSKY) WAKSMAN et HENRICI, den wir aus einer bei Calcutta gesammelten Bodenprobe isoliert hatten, liessen sich antibiotisch wirksame Stoffe nachweisen. Diese konnten, nach Züchtung des Mikroorganismus in Gärtank-Kultur, aus den Kulturfiltraten in Form lipophiler Basen extrahiert und durch Chromatographie an Aluminiumoxid angereichert werden. Die Hauptkomponente der aktiven Basen erhielt man dabei in kristallinem Zustand. Die Verbindung ist unseres Wissens noch nicht beschrieben worden. Wir bezeichnen sie als Acumycin<sup>2)</sup>.

*Allgemeine physikalische und chemische Eigenschaften:* Acumycin kristallisiert in farblosen Prismen, die unter Zersetzung bei 235° schmelzen. Die bis jetzt vorliegenden analytischen Befunde können in einer vorläufigen<sup>3)</sup> Bruttoformel  $C_{38}H_{61}O_{12}N$  zusammengefasst werden. Auf diese Formel berechnet enthält das Acumycin mindestens 7 nach KUHN-ROTH bestimmbare C-Methylgruppen. Weiterhin lassen sich zwei aktive H-Atome (ZEREWITINOFF) nachweisen. Bei der Titration in 80-proz. Methylcellosolve wurde ein  $pK_{MCS}^*$ -Wert<sup>4)</sup> von 6,46 und ein Äquivalentgewicht von 741 (ber. 724) festgestellt. Acumycin ist linksdrehend:  $[\alpha]_D = -92^\circ$  (Chloroform). Es zeigt im UV.-Absorptionsspektrum ein hohes Maximum bei 241 m $\mu$  (log  $\epsilon = 4,19$ ). Das in KBr aufgenommene IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) weist im Frequenzbereich der OH-Valenzschwingungen eine Doppelbande mit Maxima bei 3585 und 3560  $cm^{-1}$  auf. Bei 2703  $cm^{-1}$  zeigt es eine charakteristische Bande, welche wahrscheinlich auf die CH-Valenzschwingung einer Aldehydgruppe zurückzuführen ist. Die im Gebiet von 5,7–6,0  $\mu$  auftretenden Banden mit Maxima bei 1736, 1718 und 1686  $cm^{-1}$  deuten auf das Vorliegen von mindestens 3 Carbonylfunktionen, wobei die Bande bei 1686  $cm^{-1}$  einer  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketogruppe entsprechen dürfte. In Übereinstimmung damit stehen die intensive Bande bei 1618  $cm^{-1}$  (C=C-Valenzschwingung), das UV.-Spektrum und die Ergebnisse von Hydrierungsversuchen.

Acumycin nimmt bei der Hydrierung in Alkohol in Gegenwart von Palladium auf Kohle 2 Mol. Wasserstoff auf. Das bis anhin nur in amorphem Zustand erhaltene Produkt zeigt im IR.-Absorptionsspektrum keine Banden mehr bei 1618 und bei

<sup>1)</sup> 36. Mitt.: V. PRELOG & A. WALSER, *Helv.* 45, 631 (1962).

<sup>2)</sup> Abgeleitet aus der lateinischen Bezeichnung für Nadelchen. Die Sporen des Acumycin produzierenden Streptomyceten besitzen nadelförmige Stacheln.

<sup>3)</sup> Eine endgültige Bruttoformel wird man erst auf Grund weiterer Abbauergebnisse angeben können.

<sup>4)</sup> Vgl. W. SIMON *et al.*, *Helv.* 37, 1872 (1954). Wir danken Herrn Dr. W. SIMON, Organ.-chem. Laboratorium der ETH, Zürich, für diese Bestimmung.

1686  $\text{cm}^{-1}$ , dagegen noch eine breite, intensive Bande mit Maximum bei 1724  $\text{cm}^{-1}$ . Im UV.-Spektrum ist die hohe Absorption bei 241  $\text{m}\mu$  verschwunden. Die noch vorhandene flache Absorptionsbande bei 280  $\text{m}\mu$  ( $\epsilon = 146$ ) kann man auf die Anwesenheit einer nicht konjugierten Ketogruppe zurückführen. Bei der Hydrierung mit Platin in Eisessig werden 5 Mol. Wasserstoff absorbiert. Das amorphe Hydrierungsprodukt zeigt im untersuchten UV.-Bereich keine Absorption. Es weist im IR.-Gebiet ähnliche Banden wie das Tetrahydro-acumycin auf, wobei nun aber vergleichsweise die Intensität der Absorption im OH-Gebiet zu- und diejenige bei 1724  $\text{cm}^{-1}$  abgenommen hat. Dementsprechend verhält sich das Decahydro-Produkt im Dünnschichtchromatogramm wesentlich polarer als Acumycin und sein Tetrahydro-Produkt.

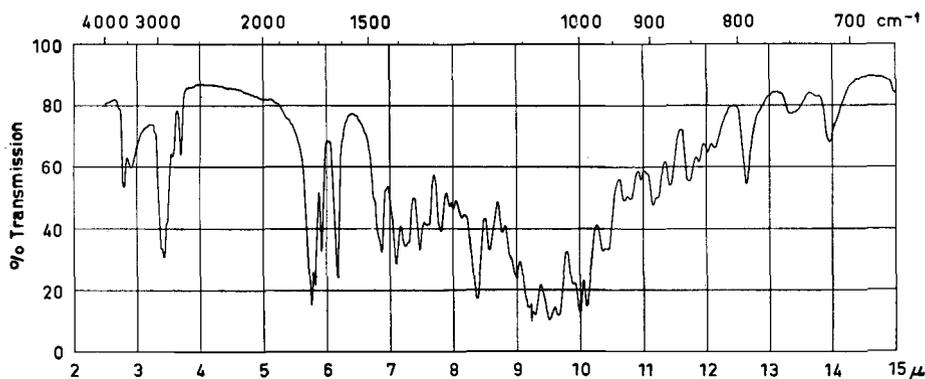


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Acumycin in KBr.

Die Ergebnisse der mikroanalytischen Gruppenbestimmungen sind beim Acumycin mit Vorsicht zu bewerten. Bei der Methylbestimmung mit Jodwasserstoffsäure wurden 0,1 O-Methyl- und 2,7 N-Methyl-Gruppen gefunden. Da die Anwesenheit einer Trimethylamino-Gruppe schon auf Grund der allgemeinen physikalischen Eigenschaften auszuschliessen war, haben wir vorerst das Vorliegen einer schwer spaltbaren  $\text{OCH}_3$ -Gruppe neben einer  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Gruppe in Betracht gezogen. Das in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommene NMR.-Spektrum (Fig. 2) zeigt jedoch im Methoxybereich bei 3,3 ppm kein entsprechendes Signal, während das Signal bei 2,57 ppm (6 Protonen) einer Dimethylaminogruppe zugeschrieben werden kann. Bei den unter energischen alkalischen Bedingungen ausgeführten O-Acetylbestimmungen erhält man variierende Mengen flüchtiger Säuren, die 1–2 Acetylgruppen äquivalent sind. Gaschromatographisch lassen sich im Destillat Essigsäure und Ameisensäure im Verhältnis von 2:1 nachweisen. Acumycin wird auch bereits unter milden alkalischen Bedingungen abgebaut, wobei ein Teil der verbrauchten Lauge zur Neutralisation freigesetzter Säuren dient. Dagegen entstehen bei der energischen Verseifung in Schwefelsäure praktisch keine flüchtigen Säuren. Entsprechend diesem Befund zeigt das NMR.-Spektrum von Acumycin im Resonanzbereich der Acetylprotonen bei 2 ppm kein Signal. Die bei der alkalischen Verseifung freigesetzte Essigsäure muss somit durch tieferegreifende Abbaureaktionen entstanden sein. Solche treten beim Decahydro-Produkt offenbar nicht auf, da es selbst unter energischen

alkalischen Bedingungen keine flüchtigen Säuren liefert. Unter milden Bedingungen verbraucht auch dieses Produkt Lauge und bildet dabei amphoterer Material. Die gemäss IR.-Spektrum noch vorliegende Carbonylfunktion könnte demnach einer Lacton-Gruppierung angehören.

Das NMR.-Spektrum des Acumycins liefert mit dem charakteristischen Signal bei 9,73 ppm eine weitere Bestätigung für die auf Grund des IR.-Spektrums vermutete Anwesenheit einer Aldehydgruppe. Für den zwischen 0,7 und 1,5 ppm liegenden Signalkomplex kann man schliesslich die sieben chemisch erfassten C-Methylgruppen verantwortlich machen.

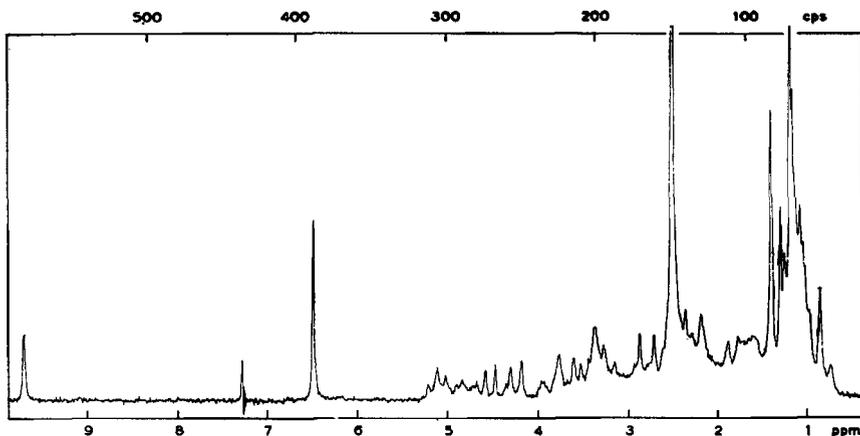


Fig. 2. NMR.-Spektrum von Acumycin in  $CDCl_3$ , aufgenommen bei 60 MHz.  
Interner Standard und Nullpunkt: Tetramethylsilan

**Nachweis und Identifizierung:** Die aufgeführten Eigenschaften von Acumycin, insbesondere der hohe C-Methylgehalt, und weiterhin die nachfolgend angegebenen mikrobiologischen Befunde deuten darauf hin, dass dieses Antibiotikum zur Gruppe der *Makrolide* gehört. Von der Mehrzahl der schon recht zahlreichen Vertreter dieser Antibiotika-Gruppe unterscheidet sich Acumycin durch sein hohes Absorptionsmaximum bei 241  $\mu$ . Bei dieser Wellenlänge zeigen lediglich Carbomycin<sup>5)</sup>, Angolamycin<sup>6)</sup>, das Antibiotikum PA-148<sup>7)</sup> und das Antibiotikum «PA-148-Contaminant»<sup>7)</sup> eine starke Absorption. Das letztere ist rechtsdrehend und somit leicht von Acumycin zu unterscheiden. Das amorphe PA-148 ist u. a. durch sein papierchromatographisches Verhalten im Vergleich zu Carbomycin charakterisiert worden. Auf Grund publizierter Daten unterscheidet es sich deutlich von Carbomycin in einer Reihe von ZAFFARONI-Systemen<sup>8)</sup>. Acumycin verhält sich dagegen in diesen

<sup>5)</sup> R. L. WAGNER, F. A. HOCHSTEIN, K. MURAI, N. MESSINA & P. P. REGNA, J. Amer. chem. Soc. 75, 4684 (1953).

<sup>6)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, Helv. 38, 1202 (1955).

<sup>7)</sup> K. MURAI, B. A. SOBIN, W. D. CELMER & F. W. TANNER, Antibiotics & Chemotherapy 9, 485 (1959).

<sup>8)</sup> A. ZAFFARONI, R. B. BURTON & E. H. KAUFMANN, Science 111, 6 (1950).

Systemen sehr ähnlich wie Carbomycin. Dies wird aus Tabelle 1 ersichtlich, in welcher das Ergebnis eines direkten papierchromatographischen Vergleiches von Acumycin mit bekannten Makrolid-Antibiotika aufgeführt ist.

Tabelle 1. *Rf*-Werte in ZAFFARONI-Systemen.

WHATMAN-Papier Nr. 1. Bioautographische Entwicklung mit *Staphylococcus aureus*

System	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K
Formamid/Benzol-Cyclohexan 1:1	0,10	0,02	0,02	0,09	0,00	0,08	0,16	0,00	0,43	0,06
Formamid/Benzol	0,69	0,16	0,07	0,68	0,22	0,66	0,74	0,04	0,85	0,47
Formamid/Benzol-Chloroform 3:1	0,80	0,26	0,16	0,79	0,43	0,78	0,80	0,11	0,91	0,62
Formamid/Benzol-Chloroform 1:1	0,96	0,82	0,69	0,96	0,86	0,95	0,93	0,40	0,93	0,81
A Acumycin	E Foromacidin A <sup>10)</sup>		I Narbomycin <sup>12)</sup>							
B Angolamycin <sup>9)</sup>	F Foromacidin B <sup>10)</sup>		K Pikromycin <sup>13)</sup>							
C Tylosin <sup>9)</sup>	G Foromacidin C <sup>10)</sup>									
D Carbomycin <sup>5)</sup>	H Erythromycin <sup>11)</sup>									

Fig. 3 zeigt die Photokopie eines Dünnschichtchromatogrammes von Acumycin und einigen Makrolid-Antibiotica.

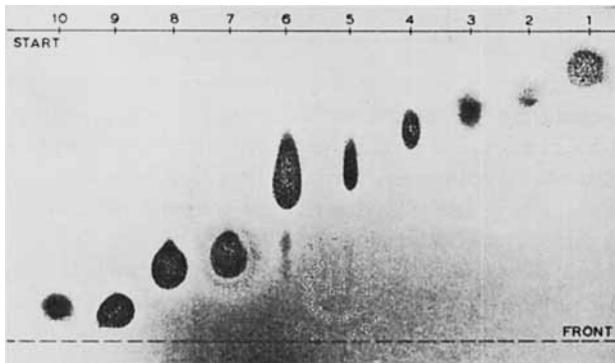


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm von Acumycin und bekannten Makrolid-Antibiotica.

Fliessmittel: Aceton-Wasser 98:2. Entwickler: *Bac. subtilis*.

1 Erythromycin, 2 Pikromycin, 3 Narbomycin, 4 Foromacidin A, 5 Foromacidin B, 6 Foromacidin C, 7 Angolamycin, 8 Tylosin, 9 Carbomycin, 10 Acumycin

Die Substanzen wurden bioautographisch sichtbar gemacht, indem man vom Dünnschichtchromatogramm vorerst einen Abdruck auf einer mit Bakterienkeimen beimpften und mit Filterpapier belegten Agarplatte herstellte und hierauf nach Entfernung von Dünnschichtplatte und

<sup>9)</sup> R. L. HAMILL, M. E. HANEY JR., M. STAMPER & P. F. WILEY, *Antibiotics & Chemotherapy* 11, 328 (1961).

<sup>10)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, E. KYBURZ, L. NEIPP, V. PRELOG, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, *Helv.* 39, 304 (1956).

<sup>11)</sup> E. H. FLYNN, M. V. SIGAL JR., P. F. WILEY & K. GERZON, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 3121 (1954).

<sup>12)</sup> R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, W. KELLER, F. KRADOLFER, E. KYBURZ, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, *Helv.* 38, 935 (1955).

<sup>13)</sup> H. BROCKMANN, H.-B. KÖNIG & R. OSTER, *Chem. Ber.* 87, 856 (1954).

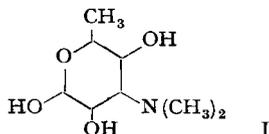
Filterpapier inkubierte. Die in der Photokopie dunkel erscheinenden Flecke entsprechen im Original den nach der Inkubation auf der trüben Agarplatte auftretenden transparenten Hemmzonen. Diese Methode hat gegenüber den üblichen Nachweisverfahren in der Dünnschichtchromatographie – beispielweise Erhitzen mit Schwefelsäure – den Vorteil, dass auch rohe Antibiotica-präparate, die noch grosse Mengen inaktiver Begleitstoffe enthalten, dünnschichtchromatographisch geprüft werden können<sup>14)</sup>.

Aus Fig. 3 wird u. a. der deutliche Unterschied zwischen Acumycin und Angolamycin ersichtlich. Dagegen verhält sich Acumycin auch dünnschichtchromatographisch recht ähnlich wie Carbomycin. Dies gilt ebenfalls für eine Reihe weiterer Fließmittel, die geprüft wurden (vgl. Tab. 4, exp. Teil). Acumycin lässt sich weiterhin kaum durch Schmelzpunkt und pK-Wert von Carbomycin unterscheiden. Jedoch besitzt es vergleichsweise eine um 34° negativere spezifische Drehung und zeigt ein anderes Verhalten bei den Farbreaktionen nach FISCHBACH & LEVINE<sup>15)</sup> (Tab. 2).

Tabelle 2. Makrolid-Farbreaktion nach FISCHBACH & LEVINE<sup>15)</sup>

Antibiotikum	Erythromycintest	Carbomycintest
Acumycin	schwach rosa	keine Verfärbung
Carbomycin	blass braun-violett	intensiv violett-rot
Erythromycin	pupur, CHCl <sub>3</sub> violett	blass gelb

*Abbauversuche:* Acumycin wird bei der energischen Hydrolyse mit 30-proz. Salzsäure unter Abscheidung huminartiger Substanzen weitgehend zerstört. In der Reaktionslösung kann man eine reduzierende Substanz nachweisen, die sich papierchromatographisch wie Mycaminose verhält. Dies liess sich in einem präparativen Versuch bestätigen: Der bei der Hydrolyse entstandene rohe Aminozucker wurde zur Reinigung in ein leicht kristallisierendes Methylglykosid C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N übergeführt. Nach erneuter Hydrolyse mit Salzsäure erhielt man daraus das Hydrochlorid der reduzierenden Abbaubase in kristallinem Zustand. Es wurde durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, IR.-Spektrum und Papierchromatographie als Mycaminose-(I)-hydrochlorid-hydrat<sup>16)</sup> identifiziert. Mycaminose wurde erstmals aus Carbomycin erhalten. Inzwischen ist diese Verbindung in einer Reihe weiterer Makrolid-Antibiotica nachgewiesen worden<sup>17)</sup>.



<sup>14)</sup> Wir danken den Herren Dr. W. KELLER-SCHIERLEIN und Dr. F. BUZZETTI, Organ.-chem. Lab. der ETH, Zürich, für Angaben über ihre Technik der bioautographischen Entwicklung von Dünnschichtchromatogrammen. Eine andere Technik beschreiben J. R. NICOLAUS, C. CORONELLI & A. BINAGHI, *Il Farmaco* 16, 349 (1961).

<sup>15)</sup> H. FISCHBACH & J. LEVINE, *Antibiotics & Chemotherapy* 3, 1159 (1953).

<sup>16)</sup> F. A. HOCHSTEIN & P. P. REGNA, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3353 (1955). Wir danken Herrn Prof. Dr. R. B. WOODWARD, Harvard University, Cambridge, USA, für die Überlassung einer Vergleichsprobe.

<sup>17)</sup> Vgl. R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER, *Arch. Mikrobiol.* 39, 158 (1961).

Acumycin wird auch unter milden sauren Bedingungen rasch abgebaut. Neben einer basischen Fraktion kann man aus dem Reaktionsgemisch eine labile, bei 70°/0,05 Torr destillierende Substanz als farbloses Öl isolieren. Sie erscheint im Dünnschichtchromatogramm einheitlich und verschieden von Mycarose<sup>17)</sup> und Cladinose<sup>17)</sup>. Die Analyse ergibt eine Bruttozusammensetzung C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>. Die Verbindung reduziert FEHLING'sche Lösung schon bei Raumtemperatur und ammoniakalisches Silbernitrat in der Wärme. Nach ROTH-KUHN enthält sie eine C-Methylgruppe. Auf Grund dieser Eigenschaften darf man annehmen, dass sie den in Makroliden nachweisbaren neutralen Desoxyzuckern entspricht. Weitere Versuche zu ihrer Strukturauflösung sind im Gange. Die bei der Hydrolyse erhaltene basische Fraktion ist ein schwer zu trennendes Gemisch nahe verwandter Verbindungen, die noch das Strukturelement der Mycaminose enthalten. Der gegenüber Acumycin um ca. 1 Einheit erhöhte pK-Wert lässt den Schluss zu, dass die Verbindung C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> im Acumycin glykosidisch an den Mycaminose-Rest gebunden vorliegt<sup>18)</sup>. Auf Grund des UV.-Absorptionsspektrums der basischen Fraktion muss man fernerhin annehmen, dass während der Spaltung teilweise ein  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigtes Carbonylsystem gebildet wurde.

**Biologische Aktivität:** Acumycin besitzt *in vitro* eine hohe Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien. Das Wirkungsbild ist sowohl qualitativ als auch quantitativ sehr ähnlich demjenigen von bekannten, z. T. therapeutisch verwerteten Makrolid-Antibiotica. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die in unserer Testanordnung gefundenen Werte. Interessant ist dabei, dass Acumycin mit Pikromycin partiell gekreuzte Resistenz aufweist, d. h. dass es gegenüber einem auf Pikromycin resistenten Staphylokokkenstamm nach 24stündiger Inkubation zwar eine stark verminderte, aber doch noch deutlich feststellbare Wirkung aufweist, die erst nach längerer Inkubation verschwindet. Ein ähnliches Verhalten zeigen Carbomycin, Leukomycin, Tylosin und Niddamycin, während beispielsweise Erythromycin und

Tabelle 3. Antibakterielle Aktivität im Verdünnungstest

Testorganismus	Minimale Hemmkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	A	B	C	D	E
<i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	1	10	10	100	100
<i>St. aureus</i> Pikromycin resistent . . . . .	100	>100	100	>100	>100
<i>Streptococcus hemolyticus</i> . . . . .	1	1	1	10	10
<i>Streptococcus viridans</i> . . . . .	10	10	10	100	10
<i>Streptococcus faecalis</i> . . . . .	10	1	10	10	100
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> . . . . .	0,1	0,1	1	1	10
<i>Vibrio el Tor</i> . . . . .	10	100	100		>100
<i>Bacillus megatherium</i> . . . . .	1	10	1	10	10
<i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	1	1	10	100	100
<i>Mycobact. paratuberculosis</i> . . . . .	10	10	100	100	100

A Acumycin, B Erythromycin, C Carbomycin, D Oleandomycin,  
E Pikromycin

<sup>18)</sup> Vgl. R. B. WOODWARD, Angew. Chem. 69, 50 (1957): Struktur und Biogenese der Makrolide.

Oleandomycin volle gekreuzte Resistenz mit Pikromycin aufweisen<sup>17)</sup>. Acumycin und die weiteren in der Tabelle aufgeführten Antibiotika zeigten bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml keine Wirkung gegenüber *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Salmonella schottmülleri*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* Typ A, *Pasteurella pestis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida vulgaris* und *Candida albicans*.

Acumycin wirkt gegenüber grampositiven Keimen auch *in vivo*, und zwar sowohl bei subcutaner wie auch oraler Applikation. Beispielsweise können Mäuse, die mit *Staphylococcus aureus* letal infiziert wurden, mit einer einmaligen subcutanen Dosis von 25 mg/kg zu 50% am Leben erhalten werden.

Herrn Dr. R. ZÜRCHER danken wir für die Aufnahme der Spektren und für die Diskussion des NMR.-Spektrums; Herrn Dr. PADOWETZ für die mikroanalytischen Bestimmungen und Herrn E. VON ARX für die Ausführung der Dünnschicht- und Papier-Chromatogramme.

### Experimenteller Teil

**Allgemeines:** Die Smp. wurden in der Glaskapillare bestimmt und sind korrigiert. Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem CARY-Spektrographen, Modell 14 M-50, die IR.-Absorptionsspektren mit einem PERKIN-ELMER Zweistrahl-Spektrographen, Modell 21, und die NMR.-Spektren auf einem VARIAN-Spektrometer, Modell DP-60, aufgenommen.

Die Dünnschichtchromatogramme wurden nach STAHL<sup>19)</sup> an Kieselgel G der Firma MERCK A.-G., Darmstadt, ausgeführt. Für die bioautographische Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme überdeckte man eine mit Bakterienkeimen beimpfte Agarschicht vorerst mit einem dünnen Filterpapier<sup>20)</sup>. Hierauf legte man die luftgetrocknete Dünnschichtplatte vorsichtig auf das Filterpapier auf und presste sie während 20 Minuten durch Aufsetzen eines Gewichtes von ca. 2 kg auf die Unterlage. Nach Entfernung von Platte und Filterpapier wurde die Agarschicht 16–18 Std. bei 37° inkubiert.

**Beschreibung des Organismus:** Der *Streptomyces*-Stamm ETH 23112 wurde aus einer Bodenprobe isoliert, die in der Umgebung von Calcutta, Indien, gesammelt worden war. Er ist durch folgende Merkmale charakterisiert<sup>21)</sup>: 1. Sporen 0,6–1,4 × 0,5–1,2 µ gross, mit 0,2–0,3 µ langen, an der Basis leicht verbreiterten Stacheln; 2. Luftmycel anfangs weissgrau, später aschgrau (*cinereus*); 3. Sporenketten monopodial verzweigt, mit offenen, regelmässigen Spiralen von meist 2–6 Windungen; 4. Keine Melaninbildung auf peptonhaltigen Nährböden; 5. Substratmycel weissgelb, gelbbraun, hellbraun oder olivgrün. Der Stamm stimmt in den wesentlichen Merkmalen mit der Typuskultur von *Streptomyces griseoflavus* (KRAINSKY) WAKSMAN *et* HENRICI überein. Aus Stämmen der Art *Streptomyces griseoflavus* sind bisher keine Makrolid-Antibiotika beschrieben worden<sup>17)</sup>.

**Züchtung:** Für die Herstellung von Acumycin wurde der Stamm ETH 23112 in Schüttel- oder Gärtank-Kultur auf folgender Nährlösung gezüchtet: Fleischmehl 2%, Malzextrakt (flüssig, ca. 50% Trockensubstanz) 2%, CaCO<sub>3</sub> 1%. Inkubationsdauer 1–2 Tage bei 27°.

**Isolierung von Acumycin:** 6600 l Kulturbrühe wurden im Zeitpunkt der höchsten antibiotischen Aktivität mit einer 10-proz. wässrigen Oxalsäurelösung auf pH 4,5 eingestellt und nach Zugabe von 66 kg Hyflo Super-Cel mit Hilfe eines Trommelfilters filtriert. Das klare Filtrat neutralisierte man mit Ammoniak auf pH 7, extrahierte, nach Zugabe von 6,45 kg Äthylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz, mit 2000 l *n*-Butylacetat in einem mehrstufigen Extraktionsapparat (LUWESTA), indem man das Kulturfiltrat unmittelbar vor dem Eintritt in die Extraktionsmaschine durch kontinuierliches Zudosieren von 1-proz. wässrigem Ammoniak auf pH 9,5–10 brachte. Der Butylacetat-Extrakt, der die Aktivität des Kulturfiltrates enthielt, wurde sofort nach Austritt aus dieser Extraktionsmaschine in einem weiteren, in Serie geschalteten Extraktionsapparat mit insgesamt 800 l verdünnter wässriger Schwefelsäure derart rückextrahiert, dass

<sup>19)</sup> E. STAHL, Chem.-Ztg. 82, 324 (1958).

<sup>20)</sup> Filterpapier Nr. 403 (glatt) der Firma MACHEREY-NAGEL & Co., Düren, Deutschland.

<sup>21)</sup> Systematik nach L. ETLINGER, R. CORBAZ & R. HÜTTER, Arch. Microbiol. 37, 326 (1958).

im Extrakt ein pH-Wert von 2–2,5 resultierte, welcher beim Austritt der wässrigen Phase aus der Maschine mit verdünnter Ammoniaklösung auf pH 6,5 zurückgestellt wurde. Mit diesem Verfahren war es möglich, das säure- und alkalilabile Antibiotikum in sehr guter Ausbeute aus dem Kulturfiltrat anzureichern. Nach Wiederholung der Operation – Extraktion mit Butylacetat aus ammoniakalischer Lösung und Rückextraktion aus organischer Phase mit Schwefelsäure – erhielt man schliesslich 150 l schwefelsauren Extrakt, der zur Entfernung von Butylacetat mit 15 l Essigester gewaschen wurde. Das Antibioticum liess sich dann im LUWESTA-Extraktor bei pH 9,5–10 in 70 l Essigester aufnehmen und nach Vakuumverdampfung bei 20° in Form eines öligen Rückstandes gewinnen. Durch Digerieren mit Petroläther erhielt man 56,6 g pulverigen, gelbbraunen Rückstand, der den grössten Teil der im Kulturfiltrat nachgewiesenen antibiotischen Aktivität enthielt.

Zur weiteren Reinigung wurden 50 g dieses Materials in 2,5 l trockenem Methylchlorid gelöst und durch eine Säule von 500 g mit 7% Wasser desaktiviertem Aluminiumoxid<sup>22)</sup> durchfiltriert. Anschliessend eluierte man noch mit weiteren 7,5 l Methylchlorid und engte das in einer Fraktion zusammengefasste, farblose Eluat im Vakuum bis zum Sirup ein. Dieser kristallisierte aus 100 ml Äther: 14,2 g Rohkristalliat nach 20 Std. bei 0°. Die Mutterlauge (22,9 g Öl) und das aus der Aluminiumoxidsäule mit 2 l Chloroform-Methanol (1:1) nacheluierte Material (9,4 g) wurden nicht weiterbearbeitet. Aus dem Rohkristalliat erhielt man durch Umkristallisieren aus Methylchlorid-Alkohol 11,2 g reines Acumycin.

*Eigenschaften von Acumycin:* Acumycin löst sich sehr gut in Methylchlorid, Chloroform und in verdünnten wässrigen Mineralsäuren. Bei Raumtemperatur ist es in Methanol, Äthanol, Aceton, Äther, Essigester und Benzol nur mässig löslich, in Petroläther unlöslich. Zur Analyse wurde aus Aceton, Methylchlorid-Alkohol und Methylchlorid-Methylpropylketon umkristallisiert. Acumycin kristallisiert aus diesen Lösungsmitteln in farblosen, kompakten Kristallen vom Smp. 233–237° (Zers.). Zur Analyse wurde 24 Std. bei 80°/0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>O<sub>12</sub>N Ber. C 63,04 H 8,49 O 26,52 N 1,93 2 akt. H 0,28%  
(723,80) Gef. „ 62,67 „ 8,27 „ 26,83 „ 1,91 „ 0,26%

Ber. 7 (C)CH<sub>3</sub> 14,56 1(CO)CH<sub>3</sub> 2,08 1(O)CH<sub>3</sub> 2,08 2 (N)CH<sub>3</sub> 4,16%  
Gef. „ 13,09 „ 3,69; 2,48<sup>23)</sup>; 0,64<sup>24)</sup> „ 0,28; 0,45 „ 5,63; 5,32%

$[\alpha]_D^{25} = -92^\circ$  ( $c = 1$ , CHCl<sub>3</sub>).  $pK_{MCS}^*$  6,46; Äquivalentgewicht 741. UV.-Absorptionsspektrum in Alkohol:  $\lambda_{max} = 241$  m $\mu$ ,  $\log \epsilon = 4,19$ . IR.-Absorptionsspektrum in KBr siehe Fig. 1. NMR-Spektrum in CDCl<sub>3</sub>, Konzentration: 166 mg/ml, siehe Fig. 2. Papierchromatographie vgl. Tab. 1. Dünnschichtchromatographie vgl. Fig. 3 und Tab. 4. Farbreaktionen vgl. Tab. 2.

Tabelle 4. Dünnschichtchromatographie von Acumycin und Referenzantibiotica aus der Makrolidgruppe

Antibiotikum	Rf-Werte in den Fließmitteln			Antibiotikum	Rf-Werte in den Fließmitteln		
	A	B	C		A	B	C
Acumycin . . . .	0,66	0,35	0,82	Foromacidin C .	0,37	0,06	0,64
Angolamycin . . .	0,65	0,18	0,82	Erythromycin . .	0,16	0,03	0,29
Tylosin . . . . .	0,68	0,07	0,81	Narbomycin . . .	0,22	0,12	0,41
Carbomycin . . . .	0,75	0,40	0,88	Pikromycin . . . .	0,22	0,07	0,36
Foromacidin A . .	0,32	0,02	0,59	Lankamycin . . .	0,74	0,37	0,87
Foromacidin B . .	0,34	0,05	0,61				

A = Methanol. B = Chloroform/Methanol = 95:5.  
C = Chloroform/Methanol = 1:1. Entwicklung mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

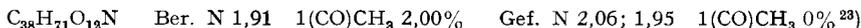
<sup>22)</sup> Aluminiumoxid basisch, Typ 5016N der Firma CAMAG, Muttenz, Schweiz.

<sup>23)</sup> Acetylbestimmung durch alkalische Verseifung.

<sup>24)</sup> Acetylbestimmung durch saure Verseifung.

*Hydrierungen*: 100 mg Acumycin wurden in 20 ml Feinsprit mit 100 mg Palladium (10%) auf Kohle im Verlaufe von 2 Std. bis zum Ende der Wasserstoffaufnahme hydriert: 1,9 Mol. H<sub>2</sub>. Das nach Filtrieren, Eindampfen und Trocknen erhaltene farblose, amorphe Hydrierungsprodukt zeigt im UV.-Spektrum eine flache Absorptionsbande mit Max. bei ca. 280 m $\mu$  ( $\epsilon = 146$ ). Im IR.-Spektrum (Nujol) sind u. a. starke Banden bei 2,85 und 5,80  $\mu$  vorhanden.

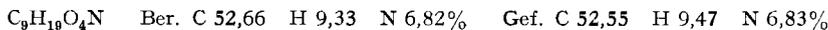
200 mg Acumycin nahmen in 20 ml Eisessig in Gegenwart von 200 mg aushydriertem Platin-oxid im Verlaufe von 4 Std. 4,8 Mol. Wasserstoff auf. Nach dem Filtrieren und Einengen im Vakuum wurde der farblose Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Hydrogencarbonat gewaschen und mit 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in der Kälte extrahiert. Aus dem Säureextrakt erhielt man das Hydrierungsprodukt, nach Rückstellung auf pH 9, durch Extraktion mit Chloroform und Eindampfen in Form eines farblosen, glasigen Lackes, der zur Analyse während 70 Std. bei 70°/0,001 Torr getrocknet wurde.



Das Decahydroprodukt zeigt im UV.-Gebiet oberhalb 210 m $\mu$  keine Absorption. Im IR.-Spektrum (Nujol) sind u. a. starke Banden bei 2,88 und 5,80  $\mu$  vorhanden.

147 mg (0,2 mMol) Decahydro-Verbindung wurden in 17,8 ml abs. Methanol und 2,20 ml 0,1N Natronlauge unter Sauerstoffausschluss während 3 Tagen bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei ca. 0,3 Äquivalent (0,07 mMol) Lauge verbraucht wurde (elektrometrische Titration mit 0,1N HCl nach Verdünnen mit 20 ml H<sub>2</sub>O). Die hierauf im Vakuum von Methanol befreite Lösung extrahierte man vorerst Hydrogencarbonat-alkalisch mit Chloroform und hierauf bei pH 2 erschöpfend mit Chloroform und Essigester. Der alkalische Chloroformextrakt enthielt 87 mg farbloses, basisches Material, welches praktisch das gleiche IR.-Spektrum wie das Ausgangsmaterial aufwies. Die wässrige Phase wurde wiederum auf pH 7 gestellt und unter pH-Kontrolle zur Trockne eingedampft. Den Salzkückstand extrahierte man mehrmals mit heissem *i*-Propanol. Der salzfreie Extrakt enthielt 44 mg amphoterer, farbloses Material, dessen IR.-Spektrum in Chloroform keine Absorption bei 5,8  $\mu$ , jedoch eine Bande bei 6,4  $\mu$  (Carboxylat-Ion) aufwies.

*Mycaminose*: 2 g Acumycin wurden in 20 ml 30-proz. HCl 2 Std. zum Sieden erhitzt. Das schwarz gefärbte Reaktionsgemisch filtrierte man durch eine Glasfilternutsche, engte im Vakuum zur Trockne ein und schüttelte den in wenig Wasser aufgenommenen Rückstand mehrmals mit Chloroform und Butanol aus. Das wässrige Raffinat wurde erneut zur Trockne eingengt und in Alkohol mit Norit behandelt, wobei nach dem Filtrieren und Eindampfen 645 mg gelbgefärbter Rückstand erhalten wurde. Diesen liess man 3 Tage bei Raumtemperatur in 30 ml mit HCl-Gas gesättigtem abs. Methanol stehen, engte im Vakuum zur Trockne ein und schüttelte den Rückstand mit Butanol und gesättigter Kaliumhydrogencarbonat-Lösung. Den Butanolextrakt dampfte man im Hochvakuum zur Trockne ein, nahm in Aceton auf, filtrierte und destillierte den nach dem Eindampfen erhaltenen gelblichen, kristallinen Rückstand (330 mg) bei 60–80°/0,01 Torr. Das kristalline, farblose Destillat (250 mg) wurde zur Analyse zweimal aus Äther-Hexan umkristallisiert und nochmals im Hochvakuum sublimiert. Smp. 74–75°.



100 mg dieses Methylglykosides erhitzte man in einer Ampulle während 2 $\frac{1}{2}$  Std. in 1,5 ml 6N HCl auf 120°. Die Reaktionslösung wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand in Alkohol mit Norit behandelt und hierauf aus Alkohol-Aceton, Alkohol und schliesslich aus Isopropanol mit einer Spur Wasser umkristallisiert, wobei Mycaminose-hydrochlorid-hydrat in farblosen Nadeln vom Smp. 105–108° erhalten wurde (I). Misch-Smp. mit authentischem Mycaminose-hydrochlorid-hydrat (Smp. 101–108°): 102–108°. IR.-Spektrum in KBr und Rf-Werte in *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (10:1:3) (Rf = 0,25), *n*-Propanol-Essigester-Wasser (7:1:2) (Rf = 0,42) und *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (10:3:3) (Rf = 0,26) gleich wie bei authentischem Material. Für die Papierchromatogramme wurden die Hydrochloride an Amberlite IRA 400 (Acetat-Form) in die essigsäuren Salze übergeführt. Der Nachweis erfolgte mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

*Milde Hydrolyse*: 3 g Acumycin liess man 42 Std. in 150 ml 0,75N Salzsäure bei Raumtemperatur stehen, neutralisierte hierauf mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 7,5 und extrahierte portionenweise mit insgesamt 300 ml Chloroform. Das wässrige Raffinat wurde mit verdünnter

Salzsäure auf pH 5 gestellt und nach Zusatz von Alkohol im Vakuum bei 35° zur Trockne eingeeengt. Den im Hochvakuum getrockneten Rückstand extrahierte man mehrmals mit insgesamt 300 ml siedendem Benzol. Die vereinigten Benzolauszüge wurden nach dem Verdampfen im Vakuum erneut in Benzol gelöst und filtriert. Der nach dem Verdampfen erhaltene gelbliche Rückstand destillierte bei 60–80°/0,1 Torr, wobei 323 mg eines farblosen, beweglichen Öles erhalten wurden, das man zur Analyse erneut unter Abtrennung eines kleinen Vor- und Nachlaufes destillierte.

$C_6H_{10}O_3$	Ber. C 55,37	H 7,75	O 36,88	1 (C)CH <sub>3</sub> 11,55%
	Gef. „ 55,56; 55,55	„ 7,93; 7,76	„ 36,51; 37,07	„ 10,96; 10,72%

Die Verbindung reduziert FEHLING'sche Lösung bei Raumtemperatur und ammoniakalisches Silbernitrat in der Wärme. Die Farbreaktionen auf 2-Desoxyzucker nach KELLER-KILIANI<sup>25)</sup> und auf Endiole nach WEYGAND-CSENDES<sup>26)</sup> verlaufen negativ. Auf dem Dünnschichtchromatogramm kann die Substanz durch Erhitzen mit Schwefelsäure oder mit ammoniakal. Silbernitrat nachgewiesen werden. Rf-Werte im Vergleich zu Mycarose und Cladinose in den Systemen a) Benzol-Dioxan (6:4), b) Cyclohexan-Essigester (2:8) und c) Chloroform-Methanol (9:1): Verbindung  $C_6H_{10}O_3$ : a) 0,42; b) 0,37; c) 0,40. Cladinose: a) 0,36; b) 0,28; c) 0,41. Mycarose: a) 0,20; b) 0,16; c) 0,21.

Das nach Verdampfung des Chloroformextraktes erhaltene basische Material wurde in Essigester aufgenommen, mit 0,1N Schwefelsäure extrahiert und nach Rückstellung des sauren Extraktes auf pH 9 erneut in Essigester aufgenommen. Die nach dem Einengen erhaltene amorphe, schwach gelbliche Substanz (576 mg) wurde zur Analyse während 70 Std. bei 50°/0,001 Torr getrocknet: Gef. 2,25% N.  $pK_{MCS}^1$  7,53; Äquivalentgew. 684<sup>4)</sup>. Im UV.-Absorptionsspektrum sind Banden mit Maxima bei 234 m $\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  85) und 272 m $\mu$  ( $E_{1cm}^{1\%}$  57) vorhanden. Das in Nujol aufgenommene IR.-Spektrum zeigt u. a. Banden bei 6,14  $\mu$ , 6,26  $\mu$ , eine Inflexion bei ca. 6  $\mu$ , und eine intensive Bande bei 5,8  $\mu$ . Bei der präparativen sauren Hydrolyse unter energischen Bedingungen entstand wiederum Mycaminoose die ohne Reinigung über das Methylglykosid direkt als kristallines Hydrochlorid-Hydrat gefasst werden konnte.

#### SUMMARY

Acumycin, a new antibiotic, could be isolated in crystalline form from cultures of a new strain, ETH 23112, of *Streptomyces griseoflavus*. On acid hydrolysis the dimethylamino-sugar mycaminoose is obtained. From this and other evidence it is concluded that acumycin belongs to the group of the macrolide antibiotics.

Institut für spezielle Botanik der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, und  
Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT,  
Pharmazeutische Abteilung, Basel

<sup>25)</sup> Ausführung nach J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* 37, 883 (1948).

<sup>26)</sup> F. WEYGAND & E. CSENDES, *Chem. Ber.* 85, 45 (1952).