

184. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

58. Mitteilung [1]

Neue Makrotetrolide aus Actinomyceten

von H. Gerlach, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, J. Seibl und H. Zähler

(18. VII. 67)

1. Isolierung und Eigenschaften. – Die bisher untersuchten Makrotetrolide Nonactin [2] [3], Monactin, Dinactin und Trinactin [4] sind Cyclotetradepside, die aus den Grundbausteinen (+)-Nonactinsäure (I), (+)-Homomonactinsäure (II), (–)-Nonactinsäure (III) und (–)-Homomonactinsäure (IV) [5] gemäss dem Schema in Tabelle 1 zusammengesetzt sind. Das hypothetische Tetranactin, das aus je 2 (+)- und (–)-Homomonactinsäureresten aufgebaut sein müsste, ist bisher nicht aufgefunden worden.

Tabelle 1. Bausteine¹⁾ der bekannten Makrotetrolide

Verbindung	Art und Anzahl der Bausteine			
	(+)-Ns (I)	(–)-Ns (III)	(+)-Hs (II)	(–)-Hs (IV)
Nonactin	2	2	–	–
Monactin	1	2	1	–
Dinactin	–	2	2	–
Trinactin	–	1	2	1
(hypoth. Tetranactin)	–	–	2	2

Vor einiger Zeit haben wir einen *Streptomyces*-Stamm isoliert, der ein Makrotetrolid-Gemisch mit auffallend niedrigem Nonactingehalt produziert. Der neue *Streptomyces*-Stamm, ETH 31442, ist nach der Systematik von ETLINGER und Mitarbeitern [6] zur Species *Streptomyces flaveolus* (WAKSMAN) WAKSMAN *et* HENRICI zu zählen.

Das von diesem Organismus produzierte nonactinarmer Makrotetrolidgemisch schien uns besonders geeignet zu sein, um darin das Tetranactin zu suchen. Eine weitgehende Auftrennung des Gemisches durch CRAIG-Verteilung und Chromatographie an Kieselgel (vgl. den exper. Teil) ergab schliesslich zwar nicht das gesuchte Tetranactin, dagegen konnten wir neben den bereits bekannten (Tabelle 1) vier neue Makrotetrolide in genügend reiner Form für eine chemische und spektroskopische Untersuchung gewinnen.

Die neuen Verbindungen, von denen man drei in kristalliner Form und eine als chromatographisch einheitliches Öl erhalten hat, wurden durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (DS) und durch die Massenspektren charakterisiert. In der Tabelle 2 sind die wichtigsten Eigenschaften zusammengestellt. Die Rf-Werte wur-

¹⁾ Im Folgenden werden in Tabellen und abgekürzten Formeln folgende Abkürzungen gebraucht: Ns = Nonactinsäure-, Hs = Homomonactinsäure-, Bs = Bishomonactinsäure-Rest.

den direkt mit denen von Dinactin ($R_D = 1$) bzw. Trinactin ($R_T = 1$) verglichen; Fließmittel: Äthylacetat (vgl. [4]).

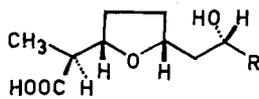
Tabelle 2. *Eigenschaften der Makrotetrolide B, C, D und G aus Streptomyces flaveolus ETH 31442*

Verbindg.	Smp.	Mol.-Gew. (aus Massenspektrum best.)	Bruttoformel	DS: R_D	DS: R_T
B	56–58°	820	$C_{46}H_{76}O_{12}$	–	0,65
C	70–71°	806	$C_{45}H_{74}O_{12}$	–	0,87
D	63–65°	792	$C_{44}H_{72}O_{12}$	–	0,75
G	Öl	778	$C_{43}H_{70}O_{12}$	0,91	–

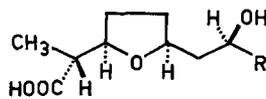
Die vier bekannten und die vier neuen Makrotetrolide stellen noch bei weitem nicht die ganze Vielfalt der Makrotetrolide des *Streptomyces*-Stammes ETH 31442 dar. Die Untersuchung von chromatographisch uneinheitlichen Fraktionen mit mittleren R_f -Werten mittels DS und Massenspektrometrie zeigte, dass in kleiner Menge noch weitere Verbindungen dieser Reihe, vor allem Isomere des Dinactins und Trinactins, vorhanden sind. Doch gelang es nicht, aus diesen Fraktionen ausser den Hauptkomponenten weitere reine Verbindungen zu isolieren.

Die drei neuen Makrotetrolide C, D und G gaben bei der reduktiven Spaltung mit Lithiumaluminiumhydrid die bekannten Alkohole Nonactindiol (V) [3] und Homononactindiol (VI) [4], sowie eine neue Verbindung $C_{12}H_{24}O_3$, das Bishomononactindiol, in variablen Verhältnissen. Im Reduktionsprodukt des Makrotetrolids B fehlte das Nonactindiol, während das Homononactindiol und das Bishomononactindiol in etwa gleichen Anteilen daraus isoliert wurden. Es steht demnach fest, dass am Aufbau der vier neuen Verbindungen ausser der Nonactinsäure und der Homononactinsäure noch ein weiterer Baustein, die Bishomononactinsäure, beteiligt ist, wobei der allgemeine Aufbau dieser Cyclotetradepside demjenigen des Nonactins [3] entspricht.

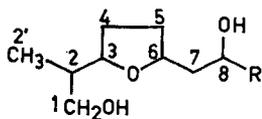
2. Die Konstitution der Bishomononactinsäure. – Die Eigenschaften der vier neuen Makrotetrolide und des Bishomononactindiols, insbesondere ihre IR.-Absorptionsspektren und chromatographischen R_f -Werte, die von denen der bekannten Verbindungen der Reihe nur wenig abweichen, erlauben die Annahme, dass der neue Baustein, die Bishomononactinsäure, der Nonactinsäure und der Homononactinsäure analog aufgebaut ist. Unter dieser Voraussetzung lässt sich aus dem NMR.-Spektrum des Bishomononactindiols dessen Konstitution als VII, und damit zwangsläufig diejenige der Bishomononactinsäure (VIII) ableiten. Das Spektrum von VII unterscheidet sich von demjenigen des Nonactindiols und des Homononactindiols zur Hauptsache dadurch, dass in der Gegend um $\delta = 1$ ppm Signale von drei statt nur zwei C-Methylgruppen zu erkennen sind. Diese Signalgruppe ist am besten als aus drei Dubletten (J ca. 6 Hz) zusammengesetzt zu interpretieren, was die Konstitution VII recht wahrscheinlich macht. Die restlichen Signalgruppen (Tabelle 3) sind mit dieser Konstitution in gutem Einklang. Das IR.-Absorptionsspektrum des Bishomononactindiols, das sich im «Fingerprint»-Gebiet von denjenigen der beiden niedrigeren Homologen deutlich unterscheidet (Fig.), zeigt eine starke Absorption im $\nu(OH)$ -Gebiet, wogegen das 6μ -Gebiet leer ist, ebenfalls in Übereinstimmung mit der Konstitution VII.



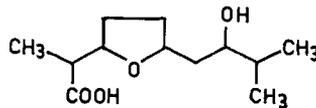
I: R = CH₃
 II: R = CH₂-CH₃



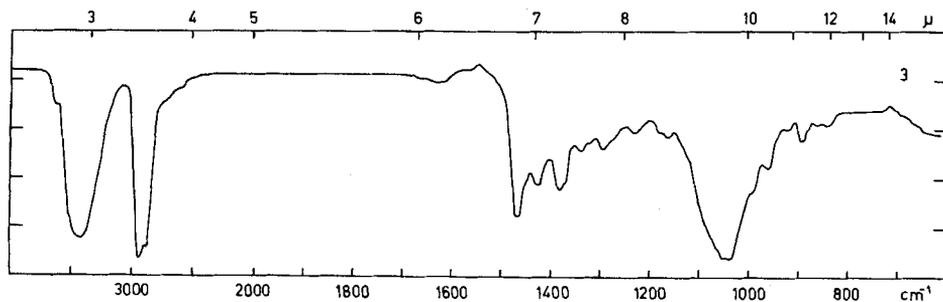
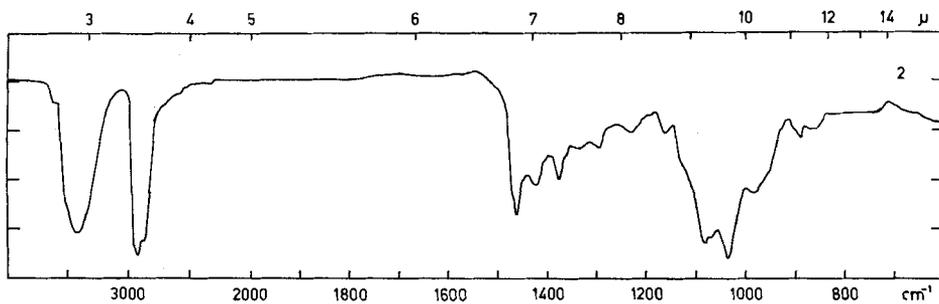
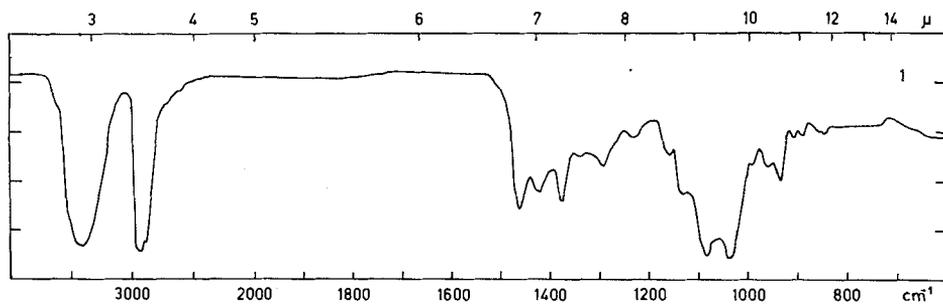
III: R = CH₃
 IV: R = CH₂-CH₃



V: R = CH₃
 VI: R = CH₂-CH₃
 VII: R = CH(CH₃)₂



VIII



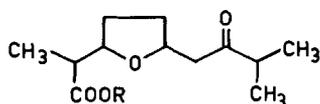
IR.-Absorptionsspektren der reduktiv erhaltenen Diole (in CCl₄)

1: Diol C₁₀H₂₀O₃ 2: Diol C₁₁H₂₂O₃ 3: Diol C₁₂H₂₄O₃

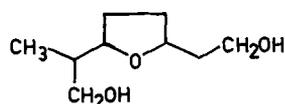
Tabelle 3. *NMR.-Spektrum des Bishomononactindiols (VII) in CCl₄*

δ (ppm)	Anzahl Protonen	Bemerkungen	Zuordnung
0,7–1,0	9	3 Dublette	3 C–CH ₃ (C-2', C-9', C-10)
1,3–2,3	8		H an C-4, C-5, C-7; C-2, C-9
3,28	2	auf Zusatz von Trifluoressigsre. nach tieferem Feld verschoben	OH an C-1 und C-8
3,3–3,7	4	2 davon als Dublett mit $J = 5,5$ Hz bei δ 3,52 ppm	H an C-1, C-3 und C-6
4,08	1		H an C-8

Für einen chemischen Beweis der Konstitution VII reichte das Bishomononactindiol aus einheitlichen Makrotetroliden nicht aus. Für die Bereitung von genügend Ausgangsmaterial für den Abbau wurde daher ein Makrotetrolidgemisch aus Nebenfraktionen und Mutterlaugen, das vorwiegend aus höheren Homologen bestand, reduktiv gespalten und das konstitutionell einheitliche aber optisch nicht reine Diol durch Verteilungschromatographie isoliert. Durch Oxydation mit Chrom(VI)-oxid erhielt man die Ketosäure IX ($R = H$), die in der Form ihres Methylesters (IX, $R = CH_3$) chromatographisch gereinigt wurde. Die Oxydation nach BAeyer-VILLIGER wurde analog zum Abbau der niedrigeren Homologen [4] ausgeführt und spaltete die Molekel in diesem Fall nahezu einheitlich zwischen den C-Atomen 8 und 9. Der rohe Isopropylester wurde mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das C-9-Diol X chromatographisch isoliert. Dieses war nach IR.-Absorptionsspektrum und DS identisch mit dem entsprechenden Abbauprodukt des Nonactindiols und Homononactindiols [4]. Die Bishomononactinsäure ist demnach nicht nur in konstitutioneller Hinsicht das Homologe VIII der Nonactinsäure und der Homononactinsäure, sondern stimmt auch in der relativen Konfiguration an den C-Atomen 2, 3 und 6 mit ihnen überein. Die Annahme, dass auch am C-Atom 8 bei allen drei Bausteinen eine analoge Chiralität besteht, ergibt sich aus Überlegungen über die Biogenese dieser Verbindungen.



IX



X

3. Die Zusammensetzung der einzelnen Makrotetrolide. – Die quantitative Zusammensetzung der neuen Makrotetrolide ergibt sich bereits aus der Art der nachgewiesenen Spaltstücke und den massenspektrometrisch bestimmten Molekulargewichten. Sie wird bestätigt durch die Ausbeuten an den Diolen IV, V und VI, die nach der Trennung durch Verteilungschromatographie erhalten wurden. Die Diole waren mit einer Ausnahme optisch aktiv (im Falle der Substanz B, die nur in sehr geringer Menge anfiel, konnten die Drehungen der Reduktionsprodukte nicht gemessen werden). Wie bei der Nonactin- und der Homononactinsäure kommen auch bei der Bishomononactinsäure wieder die rechts- und die linksdrehende Form vor. Über die Zusammensetzungen der Verbindungen B, C, D und G aus ihren Bausteinen gibt die Tabelle 4 Auskunft.

Eine bequeme Methode zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung der Zusammensetzung ist die Massenspektrometrie der Makrotetrolide. Die Massenspektren lassen zudem gewisse Aussagen über die Anordnung der Bausteine in den cyclischen Molekeln zu, wenn sie auch nur in besonderen Fällen eine eindeutige Sequenzzuordnung erlauben. Eine eingehende Diskussion der Massenspektren der früher isolierten wie auch der neuen Makrotetrolide findet sich an anderer Stelle [7]. Im Nachfolgenden werden daher deren Ergebnisse mitberücksichtigt, aber nicht im Detail diskutiert.

Tabelle 4. Bausteine der neuen Makrotetrolide

Verbindung	(+)-Ns	(-)-Ns	(+)-Hs	(-)-Hs	(+)-Bs	(-)-Bs
G $C_{43}H_{70}O_{12}$	–	2	1	–	1	–
D $C_{44}H_{72}O_{12}$	–	1	2	–	–	1
C $C_{45}H_{74}O_{12}$	–	1	1	–	1	1
B $C_{46}H_{76}O_{12}$	–	–	–	2	–	2

a) *Makrotetrolid G*. Die Verbindung gab bei der reduktiven Spaltung (+)-Nonactindiol, (–)-Homomonactindiol und (–)-Bishomonactindiol im Verhältnis von ungefähr 2:1:1. Aus den nachgewiesenen Spaltstücken errechnet man für das zu Grunde liegende Makrotetrolid eine Bruttoformel $C_{43}H_{70}O_{12}$, der das massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewicht von 778 bestens entspricht. Im Massenspektrum geben sich die drei Bausteine durch Signale bei m/e 185, 199 und 213 (Verhältnis der Intensitäten 2,35:1,85:1) zu erkennen (über die Zuordnung der Massenzahlen vgl. [7]). Das Präparat ist frei von Homologen. Das Verhältnis der Massenspitzen bei m/e 369, 383, 397 und 411 (2,3:8,1:6,2:1) entspricht keiner der möglichen Bausteinsequenzen (XIa, b und c) genau. Für die Sequenz XIc würde man ausschliesslich die Signale bei m/e 383 und 397 erwarten (vgl. [7]), während die Anordnungen XIa und XIb die vier Spitzen im theoretischen Verhältnis 1:2:2:1 geben sollten²⁾.



Die experimentellen Intensitäten sind am besten zu verstehen, wenn man annimmt, dass die Substanz G ein Gemisch ist, das vorwiegend die Verbindung XIc neben kleineren Mengen der Isomeren XIa und b enthält. Mit dieser Annahme im Einklang sind die für optisch reine Verbindungen etwas zu niedrigen spezifischen Drehungen der Abbau-Diole. Für das Bishomonactindiol wurde ein Wert von $[\alpha]_{578} = -21^\circ$, für das Homomonactindiol ein solcher von -23° und für das Nonactin-

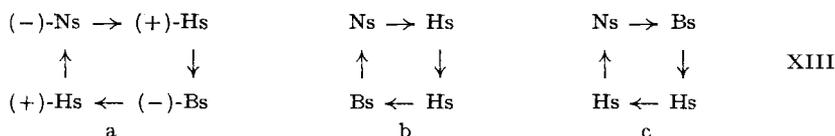
²⁾ Gemäss unseren Erfahrungen bei den einfacheren Makrotetroliden bekannter Konstitution erfolgt die Fragmentierung nicht rein statistisch. Die beobachteten Intensitäten entsprechen daher nur ungefähr den theoretisch abgeleiteten. Im allgemeinen wird eine deutliche Abnahme der Intensitäten von den niedrigeren zu den höheren Massenzahlen von homologen Fragmenten beobachtet [7].

diol +20° erhalten³⁾, während die optisch einheitlichen Diole aus reinem Dinactin absolute Drehungswerte von $[\alpha]_{578} = 30 - 34^\circ$ zeigen [4]. Aus biogenetischen Gründen ist anzunehmen, dass die für das Dinactin bewiesene stereochemische Grundsequenz XII [7] mit alternierender Anordnung der Bausteine entgegengesetzter Chiralität in der ganzen Reihe streng eingehalten wird. Ein Gemisch aus Verbindung XIc mit kleineren Anteilen XIa und b sollte demnach Diole geben, deren optische Drehungen den tatsächlich gefundenen entsprechen.



b) *Makrotetrolid D*. Dieses zeigt im Massenspektrum ein Molekel-Ion mit m/e 792 und besitzt demnach die Zusammensetzung $C_{44}H_{72}O_{12}$. Bei der reduktiven Spaltung entstehen (+)-Nonactindiol, (-)-Homomonactindiol und (+)-Bishomonactindiol im Verhältnis von etwa 1:2:1, in Übereinstimmung mit den massenspektrometrischen Intensitätsverhältnissen ($I_{185}:I_{199}:I_{213} = 1,35:2,5:1$).

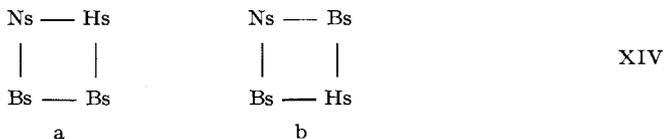
Die Intensitäten in der Region des halben Molekulargewichts ($I_{383}:I_{397}:I_{411} = 2,6:1,1:1$) entsprechen wiederum keiner der möglichen Anordnungen XIIIa, b und c gut, und die Abbau-Diole sind optisch nicht ganz einheitlich (s. im exper. Teil). Die experimentellen Befunde werden am besten erklärt durch die Annahme, dass Makrotetrolid D vorwiegend aus der Verbindung XIIIa besteht, der geringere Anteile von XIIIb und c beigemischt sind.



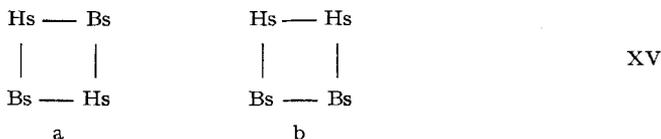
c) *Makrotetrolid C*. Die Zusammensetzung aus einem Nonactinsäure-, einem Homomonactinsäure- und zwei Bishomonactinsäure-Resten folgt sowohl aus dem Massenspektrum [7] wie aus den bei der Reduktion erhaltenen Diolen. Das Auftreten der vier massenspektrometrischen Signale bei m/e 383, 397, 411 und 425 in vergleichbaren Intensitäten (5,3:5,9:3,2:1) schliesst aus, dass das Makrotetrolid C vorwiegend aus einem der beiden Cycloisomeren mit dem Verteilungsmuster XIVb besteht, für die man in der Region um $1/2 M$ nur die Signale bei m/e 397 und 411 für ein C_{22} - und ein C_{23} -Fragment erwarten würde (vgl. [7]). Die Anordnung XIVb ist gemäss der allgemeinen Formel XII auch unwahrscheinlich, weil das Bishomonactindiol nahezu optisch inaktiv ist und Nonactindiol und Homomonactindiol entgegengesetzte Chiralität besitzen. Zwischen den vier Isomeren mit dem Verteilungsmuster XIVa lässt sich auf Grund der Massenspektren nicht entscheiden, da alle die vier Signale bei m/e 383, 397, 411 und 425 (Fragmente mit 21, 22, 23 und 24 C-Atomen) in etwa gleichen Intensitäten geben sollten. Die bei der Reduktion entstehenden Diole sind nicht optisch rein (s. exper. Teil). Demnach müssen mindestens zwei isomere Makrotetrolide mit verschiedener Chiralität und wahrscheinlich auch verschiedener Anordnung der

³⁾ Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass dem (-)-Nonactindiol die (+)-Nonactinsäure entspricht und umgekehrt [4].

Hydroxysäurereste vorhanden sein. Für die Hauptkomponente des Makrotetrolids C kommen diejenigen zwei der vier möglichen Strukturen mit dem Verteilungsmuster XIVa in Frage, die der allgemeinen Formel XII gehorchen.



d) *Makrotetrolid B*. Von dieser Verbindung wurden nur wenige Milligramme erhalten, die keine eingehende Untersuchung erlaubten. Das massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewicht von 820 passt auf eine Formel $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_{12}$. Nach der reduktiven Spaltung liessen sich dünn-schichtchromatographisch nur zwei Diole nachweisen, nämlich das Homononactindiol und das Bishomononactindiol. In Übereinstimmung damit fehlt im Massenspektrum das Signal bei m/e 185 für ein C_{10} -Fragment, die beiden Signale bei m/e 199 und 213 besitzen etwa gleiche Intensitäten (1,08:1). Diese Verbindung setzt sich demnach aus je zwei Homononactinsäure- und Bishomononactinsäure-Resten zusammen, wobei offenbar wieder ein Gemisch von Isomeren mit den Verteilungsmustern XVa und b vorliegt. Im Massenspektrum sind nämlich alle drei für die Sequenz XVb zu erwartenden Signale in der $1/2$ M -Region (m/e 397, 411 und 425, Intensitätsverhältnis 1,8:8:1) vorhanden; das mittlere, das für das Muster XVa als einziges zu erwarten wäre, überragt aber die beiden andern wesentlich stärker, als man für XVb berechnen kann (theoretisches Verhältnis für XVb 1:2:1). Da bei Makrotetroliden, die nur aus zweierlei Bausteinen aufgebaut sind, die Verhältnisse wesentlich einfacher liegen als bei solchen mit dreierlei Bausteinen, lässt sich aus den Intensitätsverhältnissen der Signale im Massenspektrum die Zusammensetzung des Gemisches ungefähr abschätzen. Dieses besteht aus etwa 7 Teilen von einem oder mehreren Isomeren mit dem Verteilungsmuster XVa und 3 Teilen von einem oder mehreren Isomeren mit dem Verteilungsmuster XVb⁴). Leider erlaubte die geringe Menge Substanz nicht, die Drehungen der Abbaudiöle zu messen, so dass über die stereochemische Bausteinsequenz keine Aussagen gemacht werden können.



Die vier neu isolierten Verbindungen erweitern die Reihe der bekannten Makrotetrolide wesentlich und wecken erneut das Interesse für das Studium der Biogenese der homologen Nonactinsäuren, für die sich aus ihren Strukturen nicht ohne weiteres ein zwingender Anhaltspunkt ergibt. Von noch grösserem Interesse ist aber der Biogenese-Schritt, bei dem die vier Bausteine miteinander verknüpft werden. Denn es zeigt sich

⁴) Unter der Voraussetzung, dass auch das Makrotetrolid B aus je 2 (+)- und (-)-Hydroxysäureresten aufgebaut ist, lassen sich vom Bausteinmuster XVa 4 (2 *meso*-Formen und ein Enantiomerenpaar), vom Muster XVb sogar 6 Stereoisomere (2 Paare von Cycloenantiomeren und 1 Paar von gewöhnlichen Enantiomeren) ableiten. Von diesen insgesamt 10 Isomeren entsprechen 4 der allgemeinen Formel XII.

bei den neuen Verbindungen, wie schon bei den früher bekannten, dass sich je zwei enantiomere Bausteine zu einer Makrotetrolidmolekel vereinigen. Ob diese für Naturstoffe ganz ungewöhnliche Stereochemie auch für die biologische Wirkung [8] und insbesondere für das Komplezierungsvermögen für Alkalimetall-Ionen [9] von Bedeutung ist, bleibt noch abzuklären.

Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, danken wir für das Ausgangsmaterial.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrographen, Modell A 60, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten, die Kopplungskonstanten in Hertz angegeben. Es bedeuten: *s* = Singlett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett, *m* = Multipllett, *b* = breite, nicht aufgelöste Signalhaufen. – Die Massenspektren (MS) wurden mit einem HITACHI-PERKIN-ELMER-Spektrometer RMU 6A aufgenommen.

Für die Dünnschichtchromatographie (DS) verwendeten wir Kieselgel G der Firma «MERCK». Die Chromatogramme wurden durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 140° entwickelt. Für Säulenchromatogramme verwendeten wir Kieselgel 0,05–0,20 mm der Firma «MERCK».

1) *Beschreibung des Actinomycetenstammes.* Der Stamm ETH 31442 stammt aus einer Bodenprobe aus der Umgebung von Delhi, Indien. Der Organismus ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet: 1. Sporen rundlich oder länglich ellipsoid, 0,7 bis 1,2 \times 0,7 bis 1,5 μ gross, Oberfläche mit feinen, bis 2,5 μ langen flexiblen Haaren besetzt. 2. Luftmycel anfangs kreideweiss bis weissgrau, in ausgereiftem Zustand aschgrau (*cinereus*). 3. Sporenketten monopodial verzweigt, in regelmässigen Spiralen von meist mehr als 5 Windungen, wechselständig und gegenständig an ebenfalls fertiler Mittelachse entstehend, selten zu wenigen in pseudoverticiller Anordnung. 4. Keine Melaninbildung auf peptonhaltigen Nährmedien. 5. Substratmycel weissgelb, hellbraun bis gelbbraun auf den meisten Medien, auf Haferflockenagar mennigrot bis fleischrot.

Nach dem System von ETTLINGER und Mitarb. [6] stimmt der Stamm ETH 31442 in allen wesentlichen Merkmalen mit dem Typusstamm von *Streptomyces flaveolus* (WAKSMAN) WAKSMAN et HENRICI überein, weshalb wir ihn zu dieser Art stellen.

2) *Fermentation.* Für die Herstellung des Makrotetrolidgemisches wurde der Stamm ETH 31442 auf einer der folgenden Nährlösungen gezüchtet: a) Sojamehl vollfett 2%, Mannit 2%; b) Distillers solubles 2%, Lactose 2%, Natriumchlorid 0,5%, Natriumnitrat 0,1%; c) Fleischmehl 2%, Malzextrakt (50% Trockensubstanz) 2%, Kalk 1%. Die Züchtung erfolgte in Submerskultur in 30-l-Fermentern oder in 300-l-Fermentern bei 27° und einer Belüftung von 1 Vol. Luft pro Vol. Nährlösung pro Minute. Die Kulturen wurden nach 2 Tagen aufgearbeitet.

3) *Extraktion und Anreicherung.* 770 l Kultur wurden bei pH 7,8 nach Zusatz von 2% Hyflo-Supercel filtriert. Den Filterkuchen (84 kg) extrahierte man mit 250 l 90-proz. Methanol, konzentrierte den Extrakt auf 50 l und vereinigte das Konzentrat mit dem Filtrat der Kulturbrühe. Dieses wurde zweimal mit 250 l Äthylacetat extrahiert und der Extrakt auf 4 l eingengt. Zur Entfernung inaktiver Basen und Säuren wurde mit verd. Salzsäure (pH 2,5–3) und 1 N Sodalösung ausgezogen und dann neutral gewaschen. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Petroläther geschüttelt. Man erhielt 68 g in Petroläther unlösliches, zähes braunes Harz mit guter Wirkung gegen *Botrytis cinerea* und *Paecilomyces varioti*, 2 Pilzstämme, die gegen Makrotetrolide besonders empfindlich sind. Die Petrolätherlösung gab 455 g öligen Rückstand mit geringer Aktivität. Aufgearbeitet wurde nur der unlösliche Anteil.

20 g dieses Rohmaterials wurden an 400 g Kieselgel chromatographiert. 800 ml abs. Chloroform und 2 l Chloroform-Äthylacetat-Gemische 9:1 und 8:2 eluierten inaktive Öle. Die ersten 500 ml Eluat mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 waren ebenfalls inaktiv, dagegen gaben die nachfolgenden 1200 ml des gleichen Elutionsmittels total 15 g hellgelbes dickflüssiges Öl, das nach DS (Chlf.-Äthylacetat 1:1 als Fliessmittel) praktisch nur noch aus Makrotetroliden bestand. Stark

braune Harze wurden in der Säule zurückgehalten. In 2 weiteren Ansätzen wurden aus den restlichen 48 g Rohmaterial noch 34,1 g Makrotetrolidgemisch erhalten.

4) *Auftrennung des Gemisches.* – *Erste CRAIG-Verteilung.* Mit einem zweiphasigen Lösungsmittelgemisch aus Petroläther, Methanol und Wasser (20:17:3) wurden 30 g Makrotetrolidgemisch über 300 Stufen nach CRAIG verteilt. Die Fraktionen wurden durch DS auf ihren Gehalt an Makrotetroliden geprüft. Fraktionen ähnlicher Zusammensetzung wurden vereinigt und im Vakuum eingedampft. Man erhielt folgende Fraktionen:

Tabelle 5. CRAIG-Verteilung von rohen Makrotetroliden

Frakt.	Verteilungsstufen	Menge	DS (Chlf.-Äthylacetat 1:1)
1	85–125	1,3 g	Rf 0,5 (Nonactin) + Spur Rf 0,4
2	126–150	3,5 g	Rf 0,4 (Monactin) + Spur Rf 0,5
3	151–170	3,6 g	Rf 0,4 u. 0,33 (Monactin + Dinactin)
4	171–190	7,0 g	Rf 0,33 u. 0,24 u. Spuren weiterer Komponenten
5	191–210	5,4 g	mehrere Komponenten mit Rf zwischen 0,35 u. 0,20
6	211–230	5,2 g	mehrere Komponenten mit Rf zwischen 0,3 u. 0,12
7	231–265	2,0 g	mehrere Komponenten mit Rf zwischen 0,21 u. 0,10
Authentisches Trinactin zeigte vergleichsweise Rf 0,22			

Nonactin. Die Fraktion 1 wurde aus ca. 60 ml Methanol umkristallisiert und gab 1,01 g farblose Nadeln, Smp. 141–142°, nach IR.-Absorptionsspektrum, Misch-Smp. und DS identisch mit Nonactin (völlig homologenfreies Nonactin schmilzt bei 146–148°; der Smp. wird erfahrungsgemäss durch geringe Mengen Monactin stark erniedrigt).

Monactin. Die Fraktion 2 kristallisierte aus ca. 50 ml Pentan bei -10° und gab 2,56 g farblose Kristalle, Smp. 62–64°; nach DS identisch mit Monactin.

Die Fraktion 3 ist gemäss DS ein Gemisch, das fast ausschliesslich aus *Monactin* und *Dinactin* besteht, und wurde nicht weiter verarbeitet.

Weiterverarbeitung der Verteilungsfraktion 7. Die Fraktion wurde im gleichen Verteilungssystem wie oben über 650 Stufen verteilt. Die gravimetrisch bestimmte Verteilungskurve zeigte ein Hauptmaximum bei Stufe 500, ein Nebenmaximum in Stufe 460 und eine Schulter bei Stufe 530. Die Aufarbeitung (s. oben) gab folgende Fraktionen (Tabelle 6):

Tabelle 6. CRAIG-Verteilung der Fraktion 7 über 650 Stufen

Frakt.	Verteilungsstufen	Menge	DS (Äthylacetat, R_T -Werte)
7a	401–415	0,05 g	Gemisch, R_T 1,0 und höher
7b	416–441	0,22 g	R_T 0,88 + wenig R_T 1,00
7c	442–459	0,25 g	R_T 0,88 und 1,00
7d	460–475	0,22 g	R_T 0,85 und 1,00
7e	476–490	0,29 g	R_T 0,85 (viel) und 0,69 (Spur)
7f	491–515	0,66 g	R_T 0,85 (Nebenkomp. in Spuren)
7g	516–525	0,10 g	R_T 0,85 und wenig 0,63
7h	526–535	0,09 g	R_T 0,85 und 0,63
7i	536–560	0,07 g	R_T 0,63
(R _T für Trinactin = 1,00)			

Makrotetrolid B. Die Fraktionen 7h und 7i (193 mg) wurden an einer Säule aus 45 g Kieselgel chromatographiert. Mit ca. 1 l Chloroform-Äthylacetat 1:1 wurden 55 mg uneinheitliche Fraktionen mit R_T zwischen 1,16 und 0,85 eluiert. Die ersten Eluate mit abs. Äthylacetat gaben ebenfalls Gemische (66 mg, R_T 0,85 und 0,65). Weitere Elution mit Äthylacetat gab 23 mg einer einheitlichen Fraktion, R_T 0,65. Durch Kristallisation aus ca. 0,5 ml Pentan bei -10° wurden 7,5 mg Kristalle vom Smp. 56–58° erhalten. Massenspektrum s. [7].

Makrotetrolid C. Die Fraktion 7f (656 mg) wurde an 200 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 8:2 und 1:1 wurden zuerst 45 mg Gemische erhalten (R_T ca. 1). Weitere Elution mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 gab 118 mg einer einheitlichen Substanz (R_T 0,85). 305 mg derselben Verbindung wurden mit Äthylacetat allein eluiert. Durch zweimalige Kristallisation aus Pentan bei -10° wurden 80 mg farblose Kristalle (Smp. 70,5–71°) erhalten. Die Mutterlaugen gaben durch nochmaliges Kristallisieren weitere 80 mg Kristalle mit gleichem Smp. 150 mg ölige Mutterlaugen waren nach DS ebenfalls einheitlich und zeigten denselben R_T -Wert wie die Kristalle. – Massenspektrum s. [7]. Das in $CDCl_3$ aufgenommene NMR.-Spektrum stimmt in den wesentlichen Merkmalen mit denen der früher untersuchten Makrotetrolide überein [4]. Der einzige erhebliche Unterschied besteht darin, dass das Integral der Signalgruppe um $\delta = 1$ ppm grösser ist und auf die Anwesenheit von 10 C-Methylgruppen hinweist.

Aus den Fraktionen 7b und 7c konnten durch Chromatographie 60 mg einheitliches *Trinactin* (R_T 1,00) isoliert werden. Dagegen wurde die Komponente mit R_T 0,88 aus diesen Fraktionen nicht rein erhalten.

Weiterverarbeitung der Fraktion 6 der ersten Verteilung. 5,2 g Fraktion 6 wurden über 700 Stufen im gleichen Lösungsmittelgemisch verteilt. Die Gewichtskurve zeigte ein Hauptmaximum in Stufe 480, ein stärkeres Nebenmaximum in Stufe 425 und mehrere sehr schwache Maxima in den Stufen 510 und 600. Die Aufarbeitung gab folgende Fraktionen (Tabelle 7):

Tabelle 7. CRAIG-Verteilung der Fraktion 6 über 700 Stufen

Frakt.	Stufen	Menge	DS (Äthylacetat, R_T -Werte)
6a	366–400	0,25 g	R_T 2,10 und 1,30 sowie mehrere Komponenten in Spuren
6b	401–440	0,98 g	R_T 1,30 und wenig 1,00
6c	441–454	0,27 g	R_T 1,30, 1,00 und 0,75
6d	455–505	2,72 g	R_T 1,00 und 0,75
6e	506–535	0,31 g	R_T 0,75 und Nebenkomp. mit kleineren R_T -Werten
6f	536–565	0,05 g	Gemisch, R_T kleiner als 0,75

Makrotetrolid D. Die Fraktion 6d wurde an 500 g Kieselgel chromatographiert. 4 l Chloroform-Äthylacetat-Gemische 8:2 und 1:1 eluierten 945 mg eines Gemisches von *Trinactin* (R_T 1,00) und Substanz D (R_T 0,75). Die nachfolgenden 500 ml Chloroform-Äthylacetat 1:1 gaben 213 mg reine Substanz D. Weitere 530 mg einheitliche Substanz D wurden mit abs. Äthylacetat erhalten. Die späteren Eluate gaben noch geringe Mengen Gemische. 320 mg der Hauptfraktion gaben aus Pentan bei -10° 215 mg farblose Kristalle, Smp. 63–65°. Massenspektrum s. [7].

Die Fraktion 6b gab nach Chromatographie an 200 g Kieselgel neben 143 mg *Trinactin* vorwiegend das *Makrotetrolid G* (s. unten).

Weiterverarbeitung der Verteilungsfraction 5. Die Fraktion 5 der ersten Verteilung (5,42 g) wurde nochmals über 650 Stufen verteilt. Die Verteilungskurve besass ein Hauptmaximum in Stufe 420 und 2 kleine Nebenmaxima in den Stufen 365 und 468. Durch Eindampfen im Vakuum wurden folgende Fraktionen erhalten (Tabelle 8):

Tabelle 8. CRAIG-Verteilung der Fraktion 5 über 650 Stufen

Frakt.	Stufen	Menge	DS (Chlf.-Äthylacetat 1:1, R_D -Werte)
5a	340–373	0,43 g	R_D 1,00 und 1,19
5b	374–390	0,24 g	R_D 1,00 (wenig) und 0,91
5c	391–443	3,91 g	R_D 0,91 und wenig <i>Trinactin</i>
5d	444–457	0,16 g	mehrere Substanzen, R_D unter 0,9
5e	458–473	0,10 g	uneinheitlich

(R_D für *Dinactin* 1,00)

Die Fraktion 5a gab bei der Chromatographie vorwiegend nicht ganz reines *Dinactin*.

Makrotetrolid G. 2 g der Fraktion 5c wurden an 600 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat-Gemischen 9:1, 8:2 und 6:4 wurden geringe Mengen uneinheitlicher Fraktionen

erhalten. Chloroform-Äthylacetat 1:1 eluierte zunächst 664 mg reine Substanz G (R_D 0,91), dann 760 mg eines Gemisches von Substanz G und Trinactin, und anschliessend 341 mg reines Trinactin. Aus dem Rest der Fraktion 5c wurden in gleicher Weise weitere 525 mg Substanz G und 304 mg Trinactin neben 700 mg Mischfraktionen erhalten. Eine Lösung von Makrotetrolid G in wenig Pentan erstarrte bei -10° im Verlauf einiger Tage zu einer wachsartigen Masse, die bei Zimmertemperatur rasch wieder flüssig wurde. Kristalle konnten nicht erhalten werden. Die Substanz G wurde daher als Öl weiter untersucht. Massenspektrum s. [7].

Die *Trinactin*-Fraktion kristallisierte aus Pentan bei -10° in farblosen Kristallen, Smp. 63–65°. Die Identifizierung erfolgte durch DS (R_T 1,00) und durch das Massenspektrum [7].

Weiterverarbeitung der Verteilungsfraktion 4. Eine erneute Verteilung und anschliessende Chromatographie gab als einheitliche Verbindungen nur *Dinactin*. Die Untersuchung zahlreicher Fraktionen mittels DS und MS zeigte die Anwesenheit mehrerer *Nebenkomponenten*, von denen aber keine rein erhalten werden konnte.

5) *Die reduktive Spaltung der Makrotetrolide* erfolgte in abs. Äther mit einem Überschuss von Lithiumaluminiumhydrid. Das überschüssige Reagens wurde mit Äthylacetat und dann mit Wasser zersetzt, die Lösung vom Niederschlag abfiltriert und dann eingedampft. Für die chromatographische Trennung der Diole wurden 30 g Celite mit der polaren Phase eines Gemisches von Heptan, Chloroform, Methanol und Wasser (8:2:5:5) imprägniert. Als Eluierungsmittel diente die unpolare Phase desselben Lösungsmittelgemisches. Es wurden Fraktionen à 25 ml aufgefangen und mittels DS geprüft. Die Fraktionen 4–7 enthielten das Diol $C_{12}H_{24}O_3$ (Rf 0,67 mit Äthylacetat-Äthylalkohol 19:1), die Fraktionen 9–13 das Diol $C_{11}H_{22}O_3$ (Rf 0,60), während das Diol $C_{10}H_{20}O_3$ (Rf 0,53) in den Fraktionen 20–40 enthalten war. Zur Analyse wurden die Diole im Hochvakuum bei 90° destilliert.

a) Das rohe Reduktionsgemisch aus ca. 2 mg *Makrotetrolid B* zeigte im DS nur die Flecke mit Rf 0,67 und 0,60 mit etwa gleicher Intensität.

b) 130 mg *Makrotetrolid C* lieferten 41 mg Diol $C_{12}H_{24}O_3$, 24 mg Diol $C_{11}H_{22}O_3$ und 12 mg $C_{10}H_{20}O_3$.

$[\alpha]_{578} = +1^\circ$ ($c = 0,88$ in Benzol). NMR.-Spektrum s. Tabelle 3. IR.-Absorptionsspektrum in CCl_4 s. Fig., Kurve 3.

$C_{11}H_{22}O_3$: $[\alpha]_{578} = -21^\circ$ ($c = 0,76$ in Benzol). Das IR.-Absorptionsspektrum in CCl_4 (Fig., Kurve 2) ist identisch mit demjenigen des linksdrehenden C_{11} -Diols aus *Dinactin* [4].

$C_{10}H_{20}O_3$: $[\alpha]_{578} = +20^\circ$ ($c = 0,39$ in Benzol). Das IR.-Absorptionsspektrum in CCl_4 (Fig., Kurve 1) ist identisch mit demjenigen des rechtsdrehenden C_{10} -Diols aus *Dinactin* [4].

c) 230 mg *Makrotetrolid D* gaben 42 mg Diol $C_{12}H_{24}O_3$, $[\alpha]_{578} = +25^\circ$ ($c = 0,56$ in Benzol), 99 mg Diol $C_{11}H_{22}O_3$, $[\alpha]_{578} = -20^\circ$ ($c = 0,46$ in Benzol) und 45 mg Diol $C_{10}H_{20}O_3$, $[\alpha]_{578} = +30^\circ$ ($c = 0,44$ in Benzol). Die Rf-Werte und IR.-Absorptionsspektren waren identisch mit denjenigen der entsprechenden Diole aus *Makrotetrolid C* und *Dinactin*.

d) 165 mg *Makrotetrolid G* gaben 35 mg Diol $C_{12}H_{24}O_3$, $[\alpha]_{578} = -21^\circ$ ($c = 0,50$ in Benzol), 30 mg Diol $C_{11}H_{22}O_3$, $[\alpha]_{578} = -23^\circ$ ($c = 0,6$ in Benzol) und 55 mg Diol $C_{10}H_{20}O_3$, $[\alpha]_{578} = +20^\circ$ ($c = 2,2$ in Benzol). Die Identifizierung mit den entsprechenden Diolen aus *Makrotetrolid C* erfolgte durch DS und IR.-Absorptionsspektren.

e) 3 g *Makrotetrolidgemisch* (Mutterlaugen und Nebenfraktionen aus den Verteilungsfractionen 6 und 7) gaben u. a. 360 mg chromatographisch reines Diol $C_{12}H_{24}O_3$.

6) *Ketosäure-methylester* $C_{13}H_{20}O_4$ (IX, $R = CH_3$). 320 mg Diol $C_{12}H_{24}O_3$ wurden, wie für die niedrigeren Homologen beschrieben [4], mit Chrom(VI)-oxid in Aceton oxydiert. Die rohe Keto-säure wurde mit Diazomethan in Äther umgesetzt und der Methylester an Kieselgel mit Benzol-Äthylacetat 3:1 chromatographiert. Nach der Destillation im Hochvakuum wurden 145 mg Keto-säure-methylester erhalten.

$C_{13}H_{24}O_4$ Ber. C 64,44 H 9,15% Gef. C 64,36 H 8,95%

IR.-Absorptionsspektrum in CCl_4 : $\nu(CO)$ 1715 u. 1740 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CCl_4 : δ 1,04 ppm (d , $J = 7$ Hz, 6 H), δ 1,06 ppm (d , $J = 7$ Hz, 3 H), δ 1,2–2,9 ppm (b , 8 H), δ 3,70 ppm (s , 3 H), δ 3,65–4,30 ppm (b , 2 H).

7) *Diol* $C_9H_{18}O_3$ (X). 100 mg *Ketosäure-methylester IX* ($R = CH_3$) wurden mit ca. 100% Überschuss einer etwa 1 N Trifluorperessigsäure-Lösung in Methylenchlorid 30 Min. zum Rück-

fluss erhitzt [9]. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in abs. Äther gelöst und mit überschüssigem Lithiumaluminiumhydrid 4 Std. zum Sieden erhitzt. Die auf übliche Weise isolierten Reaktionsprodukte wurden an einer Säule aus 15 g Celite, das mit der polaren Phase eines Gemisches aus Heptan, Chloroform, Methanol und Wasser (1:1:1:1) getränkt worden war, mit der unpolaren Phase desselben Lösungsmittelgemisches chromatographiert. Die ersten 90 ml Eluat enthielten praktisch keine Substanz. Die nächsten 60 ml gaben 32 mg Diol X, das durch Destillation bei 0,02 Torr (Sdp. ca. 90°) gereinigt wurde. DS mit Äthylacetat-Äthylalkohol (19:1): Rf 0,40, charakteristische blaue Fluoreszenz nach Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 150°, in Übereinstimmung mit dem C₉-Diol aus Homononactinsäure und Nonactinsäure [4]. Das IR.-Absorptionsspektrum in CCl₄ war identisch mit dem der Vergleichspräparate [4].

C₉H₁₈O₃ Ber. C 62,04 H 10,41% Gef. C 61,99 H 10,52%

Die Mikroanalysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MAN-SER) ausgeführt. Die IR.- und NMR.-Spektren verdanken wir unserer spektralanalytischen Abteilung (Leitung Prof. W. SIMON).

ZUSAMMENFASSUNG

Aus einem Stamm der Spezies *Streptomyces flaveolus* (WAKSMAN) WAKSMAN *et* HENRICI wurden neben Nonactin, Monactin, Dinactin und Trinactin vier neue Makrotetrolide isoliert, an deren Aufbau ausser den bekannten Hydroxysäuren Nonactinsäure und Homononactinsäure auch die Bishomononactinsäure (VIII) beteiligt ist.

Organ.-chem. Laboratorium
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich,
und Institut für Mikrobiologie
der Universität Tübingen

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 57. Mitteilung: Helv. 50, 1533 (1967).
- [2] R. CORBAZ, L. ETTLINGER, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG & H. ZÄHNER, Helv. 38, 1445 (1955).
- [3] J. DOMINGUEZ, J. D. DUNITZ, H. GERLACH & V. PRELOG, Helv. 45, 129 (1962).
- [4] J. BECK, H. GERLACH, V. PRELOG & W. VOSER, Helv. 45, 620 (1962).
- [5] H. GERLACH & V. PRELOG, Liebigs Ann. Chem. 669, 121 (1963).
- [6] L. ETTLINGER, R. CORBAZ & R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. 31, 326 (1958).
- [7] W. KELLER-SCHIERLEIN, H. GERLACH & J. SEIBL, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1966, 644.
- [8] S. N. GRAVEN, H. A. LARDY & S. ESTRADA-O., Biochemistry 6, 365 (1967), und dort zitierte frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe von H. A. LARDY; P. MUELLER & D. O. RUDIN, Biochem. biophysical Res. Commun. 26, 398 (1967).
- [9] L. A. R. PIODA, H. A. WACHTER, R. E. DOHNER & W. SIMON, Helv. 50, 1373 (1967).