

- [52] E. STARITZKY & R. M. DOUGLASS, *Analyt. Chemistry* 28, 1056 (1956).
[53] E. STARITZKY, *Analyt. Chemistry* 28, 1055, 1056 (1956).
[54] E. STARITZKY & D. T. CROMER, *Analyt. Chemistry* 28, 1211 (1956).
[55] R. M. DOUGLASS, *Analyt. Chemistry* 28, 1635 (1956).
[56] E. STARITZKY, D. T. CROMER & D. I. WALKER, *Analyt. Chemistry* 28, 1634 (1956).
[57] R. A. WALTON, R. W. MATTHEWS & C. K. JØRGENSEN, *Inorg. chim. Acta* 1, 355 (1967).
[58] C. S. G. PHILLIPS & R. J. P. WILLIAMS, «*Inorganic Chemistry*», Clarendon Press, Oxford 1965
1966.
[59] K. FAJANS, *Structure and Bonding* 3, 88 (1967).
[60] R. G. PEARSON, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 3533 (1963); *Science* 151, 172 (1966).
[61] E. KORDES, *Z. physik. Chem.* 8, 318 (1956).

144. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

69. Mitteilung [1]

Über das Venturicidin B, das Botrycidin und die Zuckerbausteine der Venturicidine A und B

von M. Brufani, W. Keller-Schierlein, W. Löffler, I. Mansperger und H. Zähler

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich
und Institut für Biologie, Lehrstuhl für Mikrobiologie, der Universität Tübingen

(11. VI. 68)

Summary. The known antibiotic Venturicidin A and two new antifungal compounds, Venturicidin B and Botrycidin, have been isolated from a strain of *Streptomyces aureofaciens* DUGGAR. Venturicidin B gave on methanolysis the methyl glycoside of 2-deoxy-D-rhamnose, Venturicidin A the corresponding 3-O-carbamate.

Das antifungische Antibioticum Venturicidin wurde erstmals 1961 von RHODES und Mitarb. [2] als eine farblose, lipophile, neutrale Verbindung $C_{43}H_{71}NO_{12}$ beschrieben. Im Verlaufe unserer Untersuchungen über antifungische Antibiotica haben wir aus einem Stamm der Art *Streptomyces aureofaciens* DUGGAR (1948) [3] (Stamm Tü 342) u. a. 2 miteinander nahe verwandte Antibiotica isoliert. Das eine davon, das in Form farbloser Nadeln vom Smp. 140–142° erhalten wurde, erwies sich als identisch mit Venturicidin¹⁾ und wird im folgenden Venturicidin A genannt. Das zweite Antibioticum, Venturicidin B, liess sich durch CRAIG-Verteilung abtrennen und wurde nach chromatographischer Reinigung als farbloses amorphes Pulver erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm an Kieselgel zeigt es einen etwas kleineren Rf-Wert als Venturicidin A, verhält sich aber bei der CRAIG-Verteilung etwas weniger polar. Im Gegensatz zum Venturicidin A enthält es keinen Stickstoff.

Unsere Analysen des *Venturicidins* A bestätigen die Formel $C_{43}H_{71}NO_{12}$, schliessen aber Formeln mit 1 CH_2 mehr oder weniger nicht aus. Da im Massenspektrum kein Molekel-Ion und keine grösseren, aus dem Molekel-Ion leicht ableitbaren Fragmente erkannt werden konnten, muss die Frage nach der genauen Bruttoformel vorläufig offengelassen werden. Für das *Venturicidin* B lässt sich aus den Analysen eine

¹⁾ Herrn Dr. A. RHODES, Glaxo Laboratories Ltd., Stoke Poges, England, danken wir bestens für eine Vergleichsprobe.

Formel $C_{42}H_{70}O_{11}$ ableiten. Die Molekel des Venturicidins A ist demnach um CONH grösser als die des Venturicidins B. Da der Stickstoff des Venturicidins A nicht basisch ist, drängt sich die Vermutung auf, dass dieses ein Carbaminsäureester des Venturicidins B ist. Damit im Einklang ist sein IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 1) mit Maxima bei 1605 und 1710 cm^{-1} , die für Carbaminsäureester charakteristisch sind [4] [5]. Die Bande bei 1605 cm^{-1} fehlt im Spektrum des Venturicidins B (Fig. 2). Entsprechend dieser Annahme gibt das Venturicidin B ein Tri-O-acetylderivat, das Venturicidin A dagegen nur ein Di-O-acetylderivat.

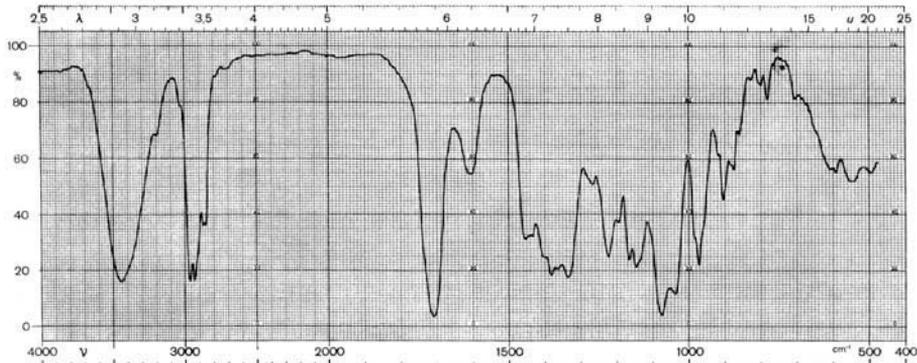


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Venturicidin A (KBr)

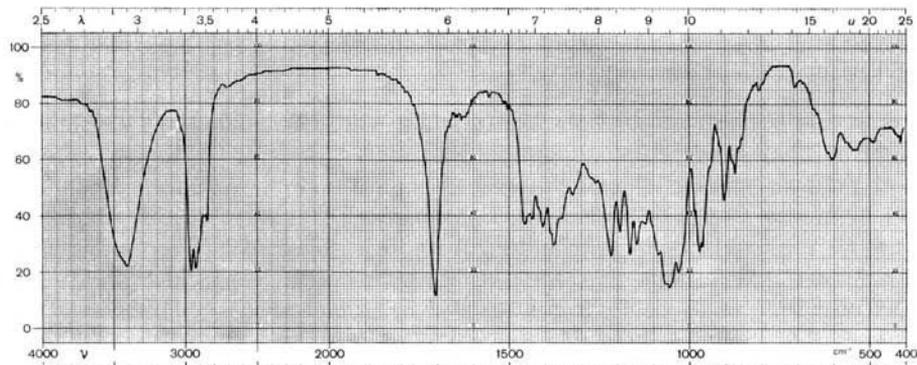


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Venturicidin B (KBr)

Eine Bestätigung dieser Vermutung ergab sich, als es gelang, aus den Venturicidinen A und B je ein zuckerartiges Abbauprodukt zu fassen und deren Beziehung zueinander und ihre vollständigen Konstitutionen aufzuklären. Venturicidin A gab bei der säurekatalysierten Methanolyse unter milden Bedingungen neben uneinheitlichen Produkten, die aus dem Aglykanteil stammen, ein kristallines Methylglykosid, $C_8H_{15}NO_5$. Die Verbindung ist neutral, und ihr IR.-Absorptionsspektrum (in Nujol) zeigt wieder die für Carbaminsäureester charakteristischen Banden bei 1715 und 1620 cm^{-1} . Der Beweis für eine Carbamat-Gruppe wurde durch den weiteren Abbau

erbracht. Die Hydrolyse mit Bariumhydroxid, analog zur Hydrolyse von 3-O-Carbamylnoviose [6], lieferte das Methylglykosid $C_7H_{14}O_4$ einer Didesoxyhexose und Bariumcarbonat.

Die Konstitution und relative Konfiguration (I) des Carbaminsäureesters folgt zwingend aus dem NMR.-Spektrum (s. exp. Teil), wobei die Zuordnung der einzelnen Signale durch Spinentkopplung gestützt wurde (vgl. Tabelle 2, S. 1302). Das Signal bei δ 4,86 ppm gehört eindeutig zum Proton in Stellung 3. Seine chemische Verschiebung entspricht derjenigen eines Wasserstoffs neben einer Acyloxygruppe. Dem Wasserstoffatom H-4 ist das Signal bei δ 3,21 ppm zuzuordnen. An C-4 muss demnach die freie Hydroxylgruppe stehen, während C-3 den Carbamat-Rest trägt. Das Signal von H-1 (δ 4,73 ppm) ist ein Doppeldublett mit den kleinen Kopplungskonstanten $J_{1e,2a} = 3,8$ cps und $J_{1e,2e} = 1,5$ cps. Daraus folgt einerseits die äquatoriale Lage von H-1, andererseits die Stellung 2 der CH_2 -Gruppe, die sich auch aus der Spinentkopplung ergibt. Die Kopplungskonstanten $J_{2a,3} = 11,5$ cps, $J_{3,4} = 9$ cps und $J_{4,5} = 9$ cps beweisen die axiale Lage der Wasserstoffatome an C-3, C-4 und C-5. Das Dublett bei δ 1,33 ppm für eine CH_3 -CH-Gruppe zeigt, dass ein 6-Desoxyzucker vorliegt. Das Abbauprodukt aus Venturicidin A ist demnach eine 3-O-Carbamyl-2-desoxy-rhamnose.

Der freie Zucker III, den wir durch Hydrolyse des Methylglykosids II chromatographisch rein erhielten, kristallisierte nicht. Er zeigte in Wasser eine optische Drehung $[\alpha]_D^{23} = +19,9^\circ$ (Endwert nach 90 Min.). In Aceton zeigte das Anomerengemisch $[\alpha]_D^{23} = +60,8^\circ$. Die linksdrehende 2-Desoxy-L-rhamnose mit $[\alpha]_D -18^\circ$ (Endwert in Wasser) haben ISELIN und REICHSTEIN [7] synthetisch hergestellt. Der Zucker III aus Venturicidin A ist demnach die 2-Desoxy-D-rhamnose. Diese ist bereits als Baustein von Antibiotica aus Actinomyceten beschrieben worden, nämlich unter dem Namen D-Chromose C als Bestandteil der Chromomycine [8] und als D-Olivose als Hydrolyseprodukt von Olivomycin [9]. Im Curacin, einem Abbauprodukt der Antibiotica Avilamycin [10] und Curamycin [11], liegt die 2-Desoxy-D-rhamnose verestert mit der Dichlorisoverninsäure vor.



Das *Venturicidin B* gab bei der Methanolyse ein rechtsdrehendes Methylglykosid, das mit dem α -Methyl-2-desoxy-D-rhamnosid (II) aus *Venturicidin A* nach Dünnschichtchromatographie, IR.- und NMR.-Spektrum identisch war.

Das Aglykon der *Venturicidine* wurde bisher nicht in reiner Form erhalten. Die ihm entsprechenden Fraktionen der Methanolyse bilden ein Gemisch von mindestens 3 Verbindungen, die durch Chromatographie kaum voneinander getrennt werden können. Die entsprechenden Fraktionen aus *Venturicidin A* und *B* zeigten aber bei der Dünnschichtchromatographie völlig identisches Verhalten, so dass wir annehmen, dass den beiden *Venturicidinen* dasselbe Aglykon zu Grunde liegt. Auch die NMR.-

Spektren der beiden Antibiotica (Fig.3) geben keinen Anhaltspunkt über Unterschiede im Aglykanteil.

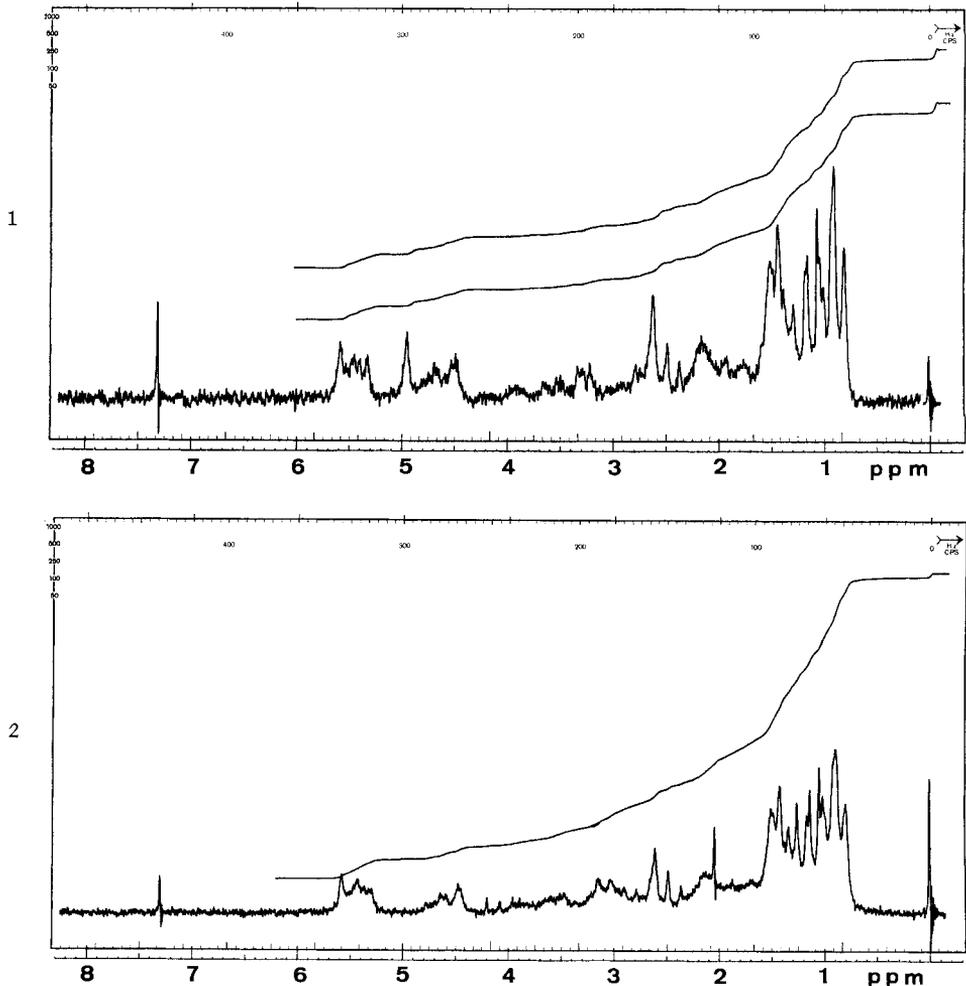


Fig. 3. Kurve 1: NMR.-Spektrum von *Venturicidin A* (CDCl_3 , 60 MC)
Kurve 2: NMR.-Spektrum von *Venturicidin B* (CDCl_3 , 60 MC)

Über die *Konstitution des Aglykons* lassen sich zur Zeit nur wenige Aussagen machen. Eine komplexe Signalgruppe im 1-ppm-Gebiet des NMR.-Spektrums (Fig. 3) deutet auf die Anwesenheit mehrerer C-Methylgruppen hin. Die Signalgruppe bei ca. 5,5 ppm lässt eine ungesättigte Gruppierung erwarten. Da das *Venturicidin B* eine starke IR.-Absorptionsbande bei 1705 cm^{-1} zeigt, muss das Aglykon mindestens eine Carbonylgruppe besitzen. Das in Chloroform aufgenommene IR.-Absorptionsspektrum von Tri-O-acetyl*venturicidin B* zeigt noch eine deutliche Bande bei 3470 cm^{-1} , was das Vorliegen mindestens einer schwer acetylierbaren Hydroxylgruppe anzeigt.

Im Verlaufe der Isolierung der Venturicidine A und B fiel noch eine dritte anti-fungisch wirksame Verbindung an, die wir wegen ihrer besonders hohen Aktivität gegen *Botrytis cinerea* Botrycidin genannt haben. *Botrycidin* ist eine lipophile, neutrale Verbindung und zeigt bei der CRAIG-Verteilung einen Verteilungskoeffizienten, der zwischen denen von Venturicidin A und B liegt. Hingegen besitzt es auf Kieselgel einen wesentlich höheren R_f-Wert als die beiden Venturicidine und lässt sich demnach durch Chromatographie leicht rein gewinnen. Chromatographisch einheitliches Botrycidin bildet ein farbloses amorphes Pulver, das sich bisher nicht kristallisieren liess. Die Mikroanalysen zeigen, dass das neue Antibioticum nur aus C, H und O besteht, doch schwanken die Analysenzahlen beträchtlich, so dass sich keine genaue Bruttoformel berechnen lässt. Gemäss den Analysen des kristallinen Tetrahydrobotrycidins (s. unten) sollte der Naturstoff die Zusammensetzung C₃₉H₆₄O₁₀ besitzen, obwohl die Analysen des amorphen Botrycidins besser auf eine Formel mit einem Sauerstoffatom mehr passen. Ein hohes UV.-Absorptionsmaximum bei 226 nm (log ε ca. 4,50) mit Nebenmaxima und Schultern bei 220, 232,5 und 241 nm deutet auf die Anwesenheit eines konjugierten Diensystems hin. Das NMR.-Spektrum (Fig. 4) weist im Gebiet von δ ca. 6–7 ppm Signale von drei Alkenprotonen auf, die im Spektrum des Hydrierungsproduktes (Fig. 5) nicht mehr vorhanden sind. Ferner besitzt das Spektrum des Botrycidins ein Singulett bei δ 2,05 ppm, das beim Hydrierungsprodukt ebenfalls fehlt, und das einer Methylgruppe an einer Doppelbindung zugeschrieben wird. Dem Chromophor kommt demnach eine der Teilformeln IV oder V zu.



Bei der katalytischen Hydrierung in Gegenwart von Palladiumkohle nimmt Botrycidin ca. 2 Mol-Äqu. Wasserstoff auf und geht in eine kristalline, gesättigte

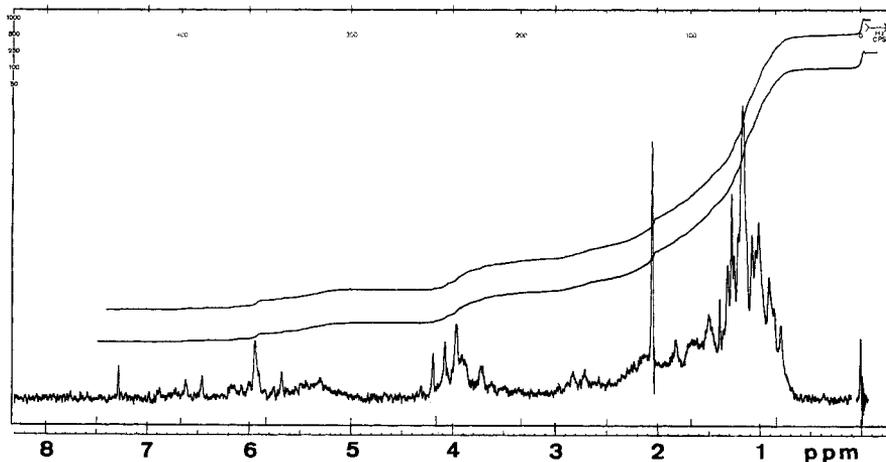


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Botrycidin (CDCl₃, 60 MC)

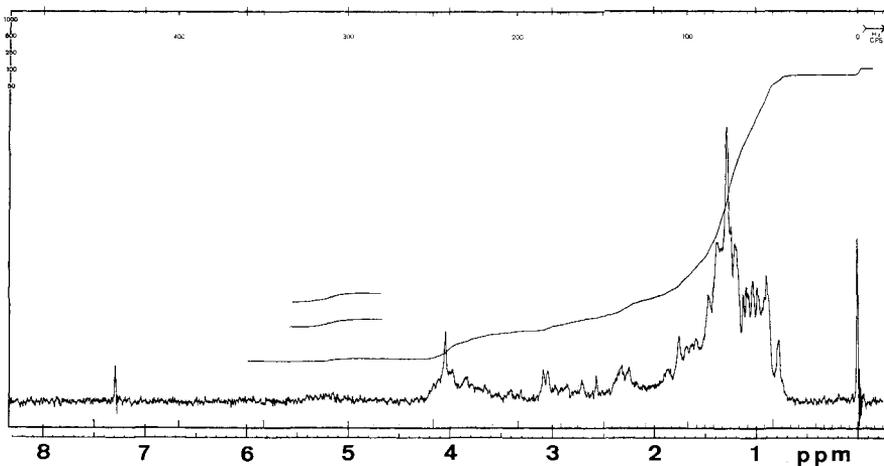
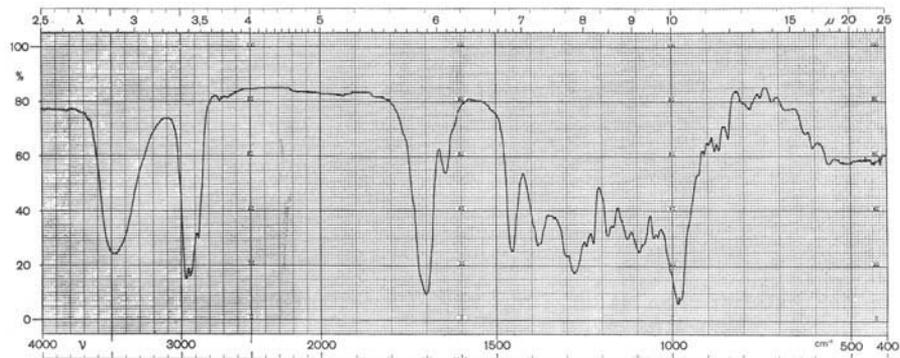
Fig. 5. NMR.-Spektrum von Tetrahydrobotrycin (CDCl_3 , 60 MC)

Fig. 6. IR.-Absorptionsspektrum von Botrycin (KBr)

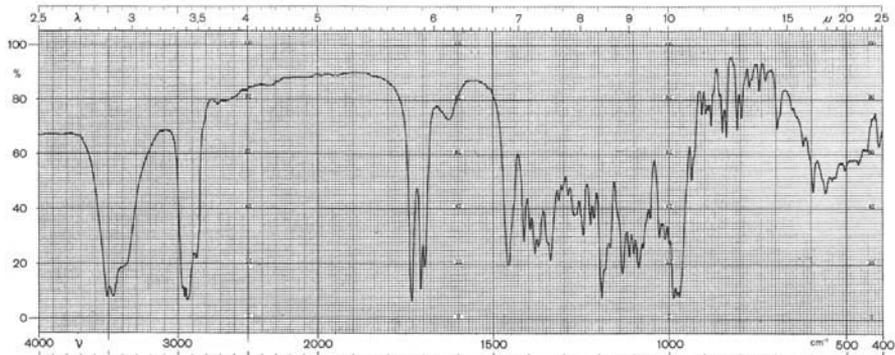


Fig. 7. IR.-Absorptionsspektrum von Tetrahydrobotrycin (KBr)

Tabelle 1. Antifungische Wirkung von Venturicidin A, B und Botrycidin

Testorganismus Name	Stamm-Nr.	Substanz ^{a)}	Hemmzonen­durchmesser bei den Konzentrationen in mg/ml ^{b)}			
			10	1	0,1	0,01
<i>Mucor mucedo</i>	Tü 181	A	10,5	9,5	8	-
		B	14	10	7	
		Botr.	25	23	14,5	
<i>Mucor miehei</i>	Tü 284	A	(7,5)	(7)	-	
		B	8	8	-	
		Botr.	18	17	12	
<i>Trichophyton mentagrophytum</i>	Tü 297	A	-	-	-	
		B	-	-	-	
		Botr.	20	15	-	
<i>Trichophyton rubrum</i>	Tü 298	A	12	12	12	
		B	(10)	(11)	(7)	
		Botr.	25	20	-	
<i>Paecilomyces varioti</i>	Tü 137	A	(11)	(10)	(7)	
		B	15	12	(10)	
		Botr.	27	26	14	
<i>Byssoschlamys nivea</i>	Tü 271	A	(17)	(16)	(14)	
		B	22	16	15	
		Botr.	33	24	15	
<i>Aspergillus terreus</i>	Tü 155	A	-	-	-	
		B	(11)	(11)	(11)	
		Botr.	17	16	(10)	
<i>Endothia parasitica</i>	Tü 163	A	(15)	(12)	(10)	
		B	(19)	(15)	(12)	
		Botr.	26	21	12	
<i>Cordyceps militaris</i>	Tü 255	A	(14)	(10)	(8)	
		B	19	14	8	
		Botr.	31	28	17	
<i>Botrytis cinerea</i> ^{c)}	Tü 157	A	31	24	24	22
		B	39	32	32	29
		Botr.	40	40	31	26
<i>Keratinomyces</i>	Tü 534	A	(10)	(10)	(8)	
		B	(14)	(12)	(10)	
		Botr.	21	19	16	
<i>Pseudogymnoascus vinaceus</i>	Tü 293	A	-	-	-	
		B	-	-	-	
		Botr.	22	20	-	

a) A = Venturicidin A, B = Venturicidin B, Botr. = Botrycidin.

b) Filterpapierscheibchen von 6 mm Durchmesser, Hemmzonen­durchmesser in mm. Eingeklammerte Zahlen bedeuten unvollständige Hemmung.

c) Testanordnung nach HÜTTER u. Mitarb. [12].

Bei Konzentrationen von 10 mg/ml wurden bei allen drei Antibiotica keine Hemmung beobachtet gegen *Ascoidea rubescens*, *Dipodascus albidus*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Keratinomyces nana* und *Ctenomyces serratus*.

Verbindung $C_{39}H_{68}O_{10}$ über, die im UV.-Absorptionsspektrum nur noch eine niedrige Absorptionsbande bei ca. 275 nm zeigt, die einer nicht konjugierten Ketogruppe zugeschrieben wird. Im NMR.-Spektrum (Fig. 5) fehlen Signale von Alkenprotonen. Im IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 7) erkennt man neben Maxima bei 1705 und 1697 cm^{-1} (Keton-Carbonyle) noch eine weitere Carbonylbande bei 1730 cm^{-1} , die für eine Estergruppe charakteristisch ist.

Die NMR.-Spektren des Botrycidins und seines Hydrierungsproduktes (Fig. 4 u. 5) weisen Signale von zahlreichen C-Methylgruppen auf. Da die CH_3 - und die CH_2 -Signale nicht scharf voneinander getrennt sind, lässt sich ihre Anzahl nur ungefähr zu ca. 10 Methylgruppen abschätzen. Dies deutet darauf hin, dass das Kohlenstoffgerüst des Botrycidins ähnlich denen der bekannten Makrolide des Erythromycin-Typus gebaut ist. Mit einem makrolidartigen Aufbau im Einklang ist ein breites NMR.-Signal bei δ ca. 5 ppm, das sowohl beim Botrycin wie auch bei seinem Hydrierungsprodukt vorhanden ist, und das man einer Gruppe $-COO-CH<$ zuschreiben kann.

Während die Acetylierung von Botrycin uneinheitlich verläuft, gibt das Tetrahydroderivat ein chromatographisch einheitliches Acetylderivat, das gemäss NMR.-Spektrum wahrscheinlich 4 Acetylgruppen enthält, deren Signale z.T. aber zusammenfallen. Daneben sind noch schwer acetylierbare Hydroxylgruppen vorhanden, denn das IR.-Absorptionsspektrum des Acetylderivates besitzt noch immer eine $\nu(OH)$ -Bande.

Im Gegensatz zu den Venturicidinen A und B scheint das Botrycin kein Glykosid zu sein, denn in den Produkten einer sauren Methanolyse konnten keine zuckerartigen Verbindungen aufgefunden werden.

Die Venturicide A und B sowie das Botrycin zeichnen sich durch eine ausgeprägte antifungische Wirkung aus, während das Wachstum von Bakterien kaum gehemmt wird. Die Tabelle 1 gibt Aufschluss über die Wirkung gegen eine Reihe von Testorganismen im Plattendiffusionstest.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, aufgenommen. Die NMR.-Spektren wurden in $CDCl_3$ mit einem VARIAN-Spektrographen, Modell A 60 (60 MHz) bzw. Modell HA 100 (100 MHz), aufgenommen. Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm) gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, Spin-Spin-Wechselwirkungen (J) in Hz angegeben; s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett.

Dünnschichtchromatogramme wurden mit Kieselgel F 254 (Fertigplatten, MERCK) ausgeführt und durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 140° entwickelt. Für Säulenchromatogramme wurde Kieselgel MERCK, 0,05–0,20 mm, verwendet.

Beschreibung des Stammes. Der Venturicine und Botrycin produzierende Actinomycetenstamm Tü 342 wurde aus einer Erdprobe isoliert, die in der Umgebung von Kocoussa, Guinea, gesammelt worden war. Es handelt sich um einen Stamm der Gattung *Streptomyces*, der durch folgende Merkmale charakterisiert ist: 1. Sporen ellipsoid, 0,6–0,9 \times 0,8–1,4 μ gross, mit glatter Oberfläche. 2. Luftmycel anfangs weiss, später graubraun bis aschgrau (*cinereus*). 3. Sporenketten monopodial verzweigt, in offenen, lockeren und unregelmässigen Schrauben mit 4–6 Windungen. 4. Auf peptonhaltigen Nährböden wird kein melaninartiges Pigment gebildet.

Diese Merkmale stimmen gut mit den von HÜTTER und Mitarb. [3] angegebenen Merkmalen für *Streptomyces aureofaciens* DUGGAR überein. Eine Besonderheit gegenüber den von uns geprüften Vergleichsstämmen von *Streptomyces aureofaciens* (Stämme ETH 8703 und ETH 13387) be-

steht darin, dass für eine optimale Entwicklung beim Stamm Tü 342 Temperaturen von 33–37° erforderlich sind, während das Temperaturoptimum für die Vergleichsstämme bei 27–30° liegt. Die gute Übereinstimmung von Stamm Tü 342 mit *Streptomyces aureofaciens* DUGGAR veranlasst uns, den Stamm zu dieser Art zu stellen.

Züchtung und Isolierung. Der Stamm Tü 342 wurde auf einer der folgenden Nährlösungen in submerser Kultur unter guter Belüftung bei 27° gezüchtet: I. 2% Sojamehl, vollfett, 2% Mannit, pH vor der Sterilisation mit Kalilauge auf 7,5 eingestellt. II. 2% Malzextrakt (ca. 50% Feststoffgehalt), 2% Distillers solubles (Maistrockneschlempe), 0,5% Kochsalz, 0,1% Natriumnitrat. III. 2% Distillers solubles, 2% Lactose, 0,5% Kochsalz, 0,1% Natriumnitrat. IV. 1% Glucose, 0,5% Pepton, 0,3% Fleischextrakt (Lab. LEMCO), 0,5% Kochsalz, 1% Kalk, pH vor der Sterilisation mit Kalilauge auf 7,2 eingestellt.

Die Kulturen wurden mit ca. 10% Impfmateriale, das auf der gleichen Nährlösung gezogen worden war, angeimpft. Nach 24-stdg. Inkubation wurden die Kulturen abgekühlt, mit 2% Filterhilfsmittel versetzt und unter Druck filtriert. Der Nachweis der biologischen Aktivität in den Kulturen erfolgte mit dem von HÜTTER und Mitarb. [12] beschriebenen Test mit *Botrytis cinerea* als Testorganismus. Der gleiche Test wurde auch für die Überprüfung aller Aufarbeitungsschritte verwendet. Eine Schwierigkeit ergab sich daraus, dass die verschiedenen Antibiotica unterschiedliche Wirkung gegen *Botrytis cinerea* zeigten.

Die Kulturfiltrate wurden zweimal mit dem halben Volumen Äthylacetat extrahiert. Wesentliche Mengen an Aktivität befanden sich auch im Filtrerrückstand und konnten aus diesem durch mehrfache Extraktion mit Methylalkohol gewonnen werden. Die methanolischen Auszüge wurden im Vakuum stark eingeeengt, mit Wasser verdünnt und anschliessend mehrfach mit Äthylacetat extrahiert. Nach dem Eintrocknen der Äthylacetatauszüge aus dem Kulturfiltrat und den Filtrerrückständen erhielt man aus 100 l Kultur einen öligen Rückstand von 80 bis 100 g.

Trennung und Reinigung der Substanzen. 40 g Rohextrakt wurden durch eine CRAIG-Verteilung über 190 Stufen vorgereinigt; Lösungsmittelgemisch: 4,25 l Tetrachlorkohlenstoff, 0,75 l Chloroform, 4,0 l Methanol, 1,0 l Wasser. Die Fraktionen 0–40 enthielten ca. 10 g inaktives Öl, in den Fraktionen 75–130 (Maximum in Stufe 100) waren die Venturicidine A und B sowie das Botrycidin enthalten, zusammen 25 g blassgelbliches amorphes Produkt. Die Fraktionen 160–190 gaben 5 g braunes, inaktives Harz. Die dazwischenliegenden Fraktionen 41–74 und 131–159 enthielten nur geringe Mengen inaktiver Substanzen.

Für die Trennung der Venturicidine wurden 21 g Substanz der Fraktionen 75–130 erneut über 600 Stufen mit dem gleichen Lösungsmittelsystem verteilt. Durch Dünnschichtchromatographie konnten folgende Substanzen nachgewiesen werden:

Fr. 265–320: Venturicidin B, Rf 0,425, schwarzer Fleck,
Fr. 310–390: Venturicidin A, Rf 0,470, schwarzer Fleck,
Fr. 290–345: Botrycidin, Rf 0,75, gelbbrauner Fleck.

Durch Eindampfen im Vakuum wurden erhalten: Fr. 265–308: 5,10 g blassgelbes amorphes Pulver, Venturicidin B + Botrycidin; Fr. 309–328: 5,39 g Venturicidin A + B + Botrycidin; Fr. 329 bis 396: 10,1 g Venturicidin A + Botrycidin, teilweise kristallin.

Venturicidin A. Das Material aus den Fraktionen 329–396 wurde an einer Säule aus 250 g Kieselgel chromatographiert. Mit 1,5 l Chloroform-Äthylacetat 1:1 wurden 1,854 g Botrycidin als gelbliches amorphes Pulver erhalten. Anschliessend eluierte 1 l Äthylacetat 5,27 g Venturicidin A, das aus Chloroform-Äther in farblosen Kristallen erhalten wurde. Zur Analyse wurde noch dreimal aus Chloroform-Äther umkristallisiert: farblose verfilzte Nadelchen, Smp. 140–142°; $[\alpha]_D = +119^\circ$ ($c = 0,5$ in Chlf.); UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} (log ϵ) 206 nm (3,80), 247 nm (2,23, Schulter), ca. 300 nm (2,08, Schulter); IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Fig. 1; NMR.-Spektrum (60 MHz) in $CDCl_3$ s. Fig. 3, oben.

$C_{43}H_{71}NO_{12}$	Ber. C 65,04	H 9,01	N 1,76%	Mol.-Gew. 794
	Gef. „ 64,77	„ 9,16	„ 1,87%	„ 798 ²⁾

Di-O-acetyl-venturicidin A. 200 mg Venturicidin A liess man mit 2 ml Essigsäureanhydrid und 0,6 ml Pyridin 16 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Nach Eindampfen im Vakuum chromato-

²⁾ Dampfdruck-Osmometrie in CH_2Cl_2 ; vgl. [13].

graphierte man den Rückstand an 20 g Kieselgel. Mit Äthylacetat wurden 205 mg chromatographisch einheitliches Produkt eluiert, das nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther farblose Kristalle mit Smp. 169–171° gab. $[\alpha]_D = +95^\circ$ ($c = 0,970$ in Chlf.). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: ν_{max} 1748, 1715 (Sch.), 1608 cm^{-1} ; NMR.-Spektrum in CDCl_3 : u. a. δ 2,00 ppm (s, 3 H), 2,06 ppm (s, 3 H). Im übrigen unterscheidet sich das Spektrum nur unwesentlich von dem des Venturicidins A.

$\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{14}$ Ber. C 64,29 H 8,61 N 1,60% Gef. C 64,30 H 8,80 N 1,70%

Venturicidin B. 4,31 g Substanz der Fraktionen 265–308 der CRAIG-Verteilung wurden an 350 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 wurden 1,76 g Botrycidin (s. oben) erhalten, Äthylacetat eluierte 1,23 g chromatographisch einheitliches Venturicidin B. Durch Umfällen aus Äthylacetat-Petroläther wurde es als farbloses amorphes Pulver erhalten, Smp. 145 bis 149°; $[\alpha]_D = +100^\circ$ ($c = 0,847$ in Chlf.); IR.-Absorptionsspektrum in KBr s. Fig. 2; NMR.-Spektrum in CDCl_3 s. Fig. 3, unten.

$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{11}$ Ber. C 67,16 H 9,40% Mol.-Gew. 751
Gef. „ 66,86 „ 9,29% „ 733²)

Tri-O-acetyl-venturicidin B. Durch Acetylierung von Venturicidin B (Ausführung wie oben) und chromatographische Reinigung des Produktes wurde das Triacetylderivat als amorphes farbloses Pulver erhalten. Smp. 150–152°. NMR.-Spektrum in CDCl_3 : u. a. δ 1,99 ppm (s, 3 H), 2,01 ppm (s, 3 H), 2,02 ppm (s, 3 H).

$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{14}$ Ber. C 65,73 H 8,73% Gef. C 65,92 H 8,54%

α -Methyl-3-O-carbamyl-2-desoxy-D-rhamnosid (I). Zu einer Lösung von 3,30 g Venturicidin A in 200 ml absol. Methanol wurden 20 ml einer 1,3 N absol. methanolischen Salzsäure gegeben. Nach 6 Std. bei 20° zeigte eine dünnschichtchromatographische Analyse das völlige Verschwinden des Ausgangsmaterials an. Die Lösung wurde im Vakuum bei 25° zur Trockne eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat) zeigte einen länglichen bräunlichen Fleck mit Rf 0,6 und einen scharfen blaugrauen Fleck mit Rf 0,28. Die Trennung erfolgte an 200 g Kieselgel. Mit Äthylacetat wurden insgesamt 1,892 g amorphe uneinheitliche Fraktionen erhalten, die sich im wesentlichen aus zwei Verbindungen (Rf 0,62 und 0,58) zusammensetzten. Äthylacetat-Methanol 8:2 gab 641 mg der Verbindung mit Rf 0,28, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther und Sublimation (100–110°, Hochvakuum) farblose Kristalle mit Smp. 146–149° bildete. $[\alpha]_D = +137^\circ$ ($c = 1,47\%$ in Aceton); IR.-Absorptionsspektrum in Nujol: $\nu(\text{OH})$ und $\nu(\text{NH})$ 3400, 3350, 3290 und 3190 cm^{-1} , $\nu(\text{CO})$ 1715, 1620 cm^{-1} . NMR.-Spektrum in CDCl_3 nach Behandlung mit D_2O (100 MHz): δ 1,33 ppm (*d*, $J = 6,2$ Hz; 3 H); 1,75 ppm (*m*, $J_{2a, 2e} = 13$ Hz, $J_{2a, 3a} = 11,5$ Hz, $J_{2a, 1e} = 3,8$ Hz; H-2a); 2,18 ppm (*m*, $J_{2e, 2a} = 13$ Hz, $J_{2e, 3a} = 5,5$ Hz, $J_{2e, 1e} = 1,5$ Hz; H-2e); 3,21 ppm (*t*, $J_{4a, 3a} = J_{4a, 5a} = 9$ Hz; H-4a); 3,30 ppm (*s*, 3 H; OCH_3); 3,66 ppm (*dg*, $J_{5a, 6} = 6,2$ Hz, $J_{5a, 4a} = 9$ Hz; H-5a); 4,73 ppm (*dd*, $J_{1e, 2a} = 3,8$ Hz, $J_{1e, 2e} = 1,5$ Hz; H-1e); 4,86 ppm (*m*, $J_{3a, 2a} = 11,5$ Hz, $J_{3a, 2e} = 5,5$ Hz, $J_{3a, 4a} = 9$ Hz; H-3a).

Tabelle 2. Spinentkopplungen

Einstrahlung entspr.	Zuordnung	entkoppeltes Signal Multiplizität	Zuordnung
1,33 ppm	3 H-6	3,66 ppm <i>d</i> , $J = 9$ Hz	H-5a
3,66 ppm	H-5a	1,33 ppm <i>s</i> , 3 H 3,21 ppm <i>d</i> , $J = 9$ Hz	3 H-6 H-4a
3,21 ppm	H-4a	3,66 ppm 4,86 ppm <i>dd</i> , $J_{3, 2a} = 11,5$ Hz $J_{3, 2e} = 5,5$ Hz	H-5a H-3a
4,73 ppm	H-1e	1,75 ppm <i>dd</i> , $J_{2a, 2e} = 13$ Hz $J_{2a, 3a} = 9$ Hz 2,18 ppm <i>dd</i> , $J_{2e, 2a} = 13$ Hz $J_{2e, 3a} = 5,5$ Hz	H-2a H-2e

Massenspektrum: u. a. m/e 205 (M), 174 ($M - OCH_3$), 161 ($M - CONH_2$), 131 ($M - OCH_3 - CONH_2 + H$), 113 ($131 - H_2O$), 104, 100 (Basispektr.).

$C_9H_{15}NO_5$	Ber. C 46,82	H 7,37	N 6,83%	Mol.-Gew. 205
	Gef. „ 46,80	„ 7,22	„ 6,88%	„ 205 (Massensp.)

Methyl-O-acetyl-O-carbamyl-2-desoxy-D-rhamnosid. 250 mg des Carbamats I wurden mit 4 ml Essigsäureanhydrid und 1 ml Pyridin wie üblich acetyliert und das Rohprodukt an 30 g Kieselgel mit Äthylacetat chromatographiert. Das Eluat (235 mg) wurde im Hochvakuum destilliert und erstarrte dann langsam zu farblosen Kristallen mit Smp. 100–110°. Das NMR.-Spektrum zeigt, dass es sich um ein Gemisch von mindestens 3 Isomeren handelt: 3 Dublette (J ca. 6,5 Hz) bei δ 1,17, 1,23 und 1,35 ppm, alle von etwa gleicher Intensität; Acetylsignale bei δ 2,00 und 2,07 ppm; OCH_3 -Singulette bei δ 3,33, 3,38 und 3,49 ppm.

$C_{10}H_{17}NO_6$	Ber. C 48,58	H 6,93	N 5,66%	Gef. C 48,53	H 6,92	N 5,61%
--------------------	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

α -Methyl-2-desoxy-D-rhamnosid (II). – a) *Aus dem Carbamat I*: 220 mg des Carbamats I in 9 ml Wasser wurden mit 6,1 ml gesättigter Bariumhydroxid-Lösung 48 Std. bei Zimmertemperatur hydrolysiert. Das ausgeschiedene Bariumcarbonat wurde abfiltriert und das überschüssige Bariumhydroxid durch Einleiten von CO_2 ausgefällt. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand an 20 g Kieselgel chromatographiert. Mit Äthylacetat wurden zunächst 50 mg Ausgangsmaterial und dann 130 mg Hydrolyseprodukt als dickflüssiges Öl mit einheitlichem Rf (0,25 mit Äthylacetat als Fließmittel) erhalten. Nach mehrtägigem Stehen erstarrte es zu farblosen Kristallen. $[\alpha]_D^{23} = +133^\circ$ ($c = 1,05$ in Aceton); IR.-Absorptionsspektrum (flüssig): $\nu(OH)$ 3400 cm^{-1} (breit), keine Bande im 6μ -Gebiet. Das IR.-Absorptionsspektrum und der Rf-Wert stimmten mit denen des Methylglykosids aus Venturicidin B (s. unten) überein. NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ (60 MHz): δ 1,29 ppm (d , $J = 6,5$ Hz, 3 H); 1,4–2,4 ppm (m , 2 H); 3,32 ppm (s , 3 H); 4,75 ppm (dd , $J_{1e, 2a} = 4,5$ Hz, $J_{1e, 2e}$ ca. 1,5 Hz, 1 H). Signale von weiteren ca. 5 H in schlecht aufgelösten Haufen zwischen δ 2,8 und 4,0 ppm.

b) *Durch Methanolyse von Venturicidin B*: Zu 850 mg Venturicidin B in 50 ml absol. Methanol wurden 5,5 ml 1,3N absol. methanolische Salzsäure gegeben. Nach 5-stdg. Stehen bei Zimmertemperatur war kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar. Die Lösung wurde im Vakuum bei 25° eingedampft und der Rückstand an 80 g Kieselgel chromatographiert. Äthylacetat eluierte 625 mg uneinheitliches Produkt mit Rf. ca. 0,6 (Dünnschichtchromatographie mit Äthylacetat), das sich von den entsprechenden Fraktionen der Methanolyse von Venturicidin A nicht unterscheiden liess. Mit Äthylacetat-Methanol 8:2 wurden 180 mg farbloses Öl erhalten. Rf. 0,25, einheitlich. $[\alpha]_D^{23} = +158^\circ$ ($c = 1,11$ in Aceton). Das NMR.-Spektrum war identisch mit demjenigen des Produktes, das durch alkalische Hydrolyse des Carbamates erhalten worden war (s. oben).

2-Desoxy-D-rhamnose (III). 85 mg α -Methyl-2-desoxy-D-rhamnosid (aus Venturicidin A, s. oben, Verfahren a) wurden mit 10 ml 0,5N Schwefelsäure $1\frac{1}{2}$ Std. auf 80–85° erwärmt. Die Schwefelsäure wurde darauf mit Bariumcarbonat neutralisiert, die Lösung filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Aceton gelöst, nochmals filtriert und eingedampft. Man erhielt 80 mg blassgelblichen klaren Sirup, der an Kieselgel mit Äthylacetat-Methanol 8:2 chromatographiert wurde. Das zähflüssige Eluat war dünn-schichtchromatographisch einheitlich (Äthylacetat-Methanol 8:2, Rf 0,30). IR.-Absorptionsspektrum (flüssig): keine Bande im 6μ -Gebiet. $[\alpha]_D^{23} = +60,8^\circ$ ($c = 0,977$ in Aceton); $+19,9^\circ$ ($c = 0,993$ in Wasser, Endwert nach 90 Min.). Durch Hydrolyse des Glykosids aus Venturicidin B wurde der gleiche Zucker erhalten (IR.-Absorptionsspektrum und Rf-Wert identisch).

Botrycidin. Die Botrycidinfraktion, die bei der Reinigung des Venturicidins A (s. oben) erhalten worden war, wurde nochmals an 30 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 8:2 wurden 1,5 g dünn-schichtchromatographisch einheitliches amorphes Pulver erhalten. $[\alpha]_{578} = -61,5^\circ$ ($c = 1\%$ in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} (log ϵ) 220 nm (Schulter, 4,47), 226 nm (4,50), 232,5 nm (4,47), 241 nm (Schulter, 4,25), ca. 295 nm (flache Schulter, 2,53). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Fig. 6; NMR.-Spektrum in $CDCl_3$: Fig. 4.

$C_{39}H_{64}O_{10}$	Ber. C 67,60	H 9,31	O 23,09%	Mol.-Gew. 692
$C_{39}H_{64}O_{11}$	„ „ 66,07	„ 9,10	„ 24,83%	„ 709
	Gef. „ 66,35	„ 9,18	„ 24,90%	„ 701 ²⁾

Tetrahydrobotrycidin. 3 g Botrycidin in 150 ml Methanol wurden mit 750 mg 10-proz. Palladiumkohle in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nach 2 Std. waren 237 ml H₂ (20°, 725 Torr) verbraucht, was etwa 2 Mol.-Äqu. entspricht, darauf kam die Hydrierung zum Stillstand. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft und der Rückstand an 30 g Kieselgel chromatographiert. Mit Äthylacetat wurden 2,56 g farbloses Eluat erhalten, das beim Benetzen mit Äther kristallisierte. Zweimaliges Umkristallisieren aus Aceton-Äther-Petroläther gab farblose Kristalle vom Smp. 156–157°. $[\alpha]_{578} = -48,5^\circ$ ($c = 0,968\%$ in Chloroform). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit: λ_{max} (log ϵ) 212 nm (2,88), 275 nm (2,20). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Fig. 7; NMR.-Spektrum in CDCl₃: Fig. 5.

C ₃₉ H ₈₈ O ₁₀	Ber. C 67,21	H 9,84%	Mol.-Gew. 696,93
	Gef. „ 67,39 67,11	„ 9,91 9,89%	„ 765 ³⁾

Aus 100 mg Tetrahydrobotrycidin in 2 ml Essigsäureanhydrid und 2 ml Pyridin wurde bei Zimmertemperatur (6 Std.) das *Acetylderivat* bereitet, das nach Chromatographie an 10 g Kieselgel ein farbloses, dünnschichtchromatographisch einheitliches Öl bildete. Das IR.-Absorptionsspektrum in Chlf. zeigte u. a. Banden bei 3460, 1733 und 1705 cm⁻¹ (Schulter). NMR.-Spektrum in CDCl₃: u. a. δ 2,02 ppm (s, 3 H), 2,08 ppm (s, ca. 9 H).

Die Mikroanalysen wurden in der analytischen Abteilung der ETH (Leitung W. MANSER) ausgeführt. Die IR.- und NMR.-Spektren verdanken wir der spektralanalytischen Abteilung der ETH (Leitung Prof. W. SIMON), die Massenspektren Herrn Dr. J. SEIBL. Die Spinentkopplungs-Experimente wurden von Frau A. VON WARTBURG und Herrn Dr. C. PASCUAL durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 68. Mitteilung: H. DIEKMANN, Arch. Mikrobiol. (im Druck).
- [2] A. RHODES, K. H. FANTES, B. BOOTHROYD, M. P. MCGONAGLE & R. CROSSE, Nature 192, 952 (1961); A. RHODES, B. BOOTHROYD, K. H. FANTES, M. P. MCGONAGLE & R. CROSSE, Deutsche Pat.-Anmeldung 1 184 458 (1964).
- [3] R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN & H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. 39, 173 (1961).
- [4] J. W. HINMAN, H. HOEKSEMA, E. L. CARON & W. G. JACKSON, J. Amer. chem. Soc. 78, 1072 (1956).
- [5] L. J. BELLAMY, The Infrared Spectra of Complex Molecules, Methuen & Co. Ltd., London 1958, S. 222.
- [6] J. W. HINMAN, E. L. CARON & H. HOEKSEMA, J. Amer. chem. Soc. 79, 3789 (1957).
- [7] B. ISELIN & T. REICHSTEIN, Helv. 27, 1146 (1944).
- [8] M. MIYAMOTO, Y. KAWAMATSU, M. SHINOHARA, K. NAKANISHI, Y. NAKADAIRA & N. S. BHACCA, Tetrahedron Letters 1964, 2371.
- [9] YU. A. BERLIN, S. E. ESIPOV, M. N. KOLOSOV, M. M. SHEMYAKIN & M. G. BRAZHNIKOVA, Tetrahedron Letters 1964, 1323.
- [10] F. BUZZETTI, F. EISENBERG, H. N. GRANT, W. KELLER-SCHIERLEIN, W. VOSER & H. ZÄHNER, Experientia 24, 320 (1968).
- [11] E. G. GROS, V. DEULOFEU, O. L. GALMARINI & B. FRYDMAN, Experientia 24, 323 (1968).
- [12] R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, J. NÜESCH & H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. 57, 1 (1965).
- [13] CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, Helv. 47, 515 (1964).

³⁾ Dampfdruck-Osmometrie in Äthylacetat.