

Die Elementaranalysen, Spektralaufnahmen und Drehungsbestimmungen wurden in unseren Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. W. PADOWETZ, R. F. ZÜRCHER, H. FUHRER und H. HÜRZELER ausgeführt.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. WIELAND & G. ANNER, *Helv.* 51, 1932 (1968).
- [2] J. SCHREIBER, M. PESARO, W. LEIMGRUBER & A. ESCHENMOSER, *Helv.* 41, 2103 (1958).
- [3] D. FELIX, P. JAKOBER & A. ESCHENMOSER, *Chimia* 19, 538 (1965).
- [4] K. ALDER, K. KAISER & M. SCHUMACHER, *Liebigs Ann. Chem.* 602, 80 (1957).

## 12. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

73. Mitteilung [1]

### Chlorothricin und Des-chlorothricin

von W. Keller-Schierlein, R. Muntwyler, W. Pache und H. Zähler

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

(3. XII. 68)

*Summary.* A crystalline mixture of the antibiotics chlorothricin and dechlorothricin was isolated from a strain of *Streptomyces antibioticus*. By degradation 5-chloro-6-methylsalicylic acid methyl ether (from chlorothricin) and 6-methylsalicylic acid methyl-ether (from dechlorothricin) were isolated. Common degradation products of both antibiotics were 2-deoxy-D-rhamnose and an aglycone,  $C_{30}H_{38}O_8$ , of unknown structure. The antibiotic mixture was active against GRAM positive bacteria on synthetic, but not on complex media.

Der Actinomycetenstamm Tü 99, der der Art *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF) WAKSMAN *et* HENRICI 1948 angehört [2], produziert mehrere Antibiotica, die auf chemisch definierten Nährböden, nicht aber auf komplexen fleischextrakt-haltigen Medien, eine hohe Wirksamkeit gegen GRAM-positive Bakterien besitzen. Zwei der aktiven Stoffe, das *Chlorothricin* und das *Des-chlorothricin*, konnten als kristallines Gemisch isoliert und charakterisiert werden. Die beiden Substanzen liessen sich aus dem Filtrerrückstand mit Methanol extrahieren. Nach dem Einengen auf ein kleines Volumen und Verdünnen mit Wasser wurden die Extrakte mit Äthylacetat ausgezogen. Eine Vorreinigung wurde erzielt durch Ausschütteln der Äthylacetatlösung mittels Soda und Überführen der sauren Anteile in Äthylacetat. Eine antibiotische Wirkung war ausschliesslich in den sauren Anteilen nachweisbar. Im Kulturfiltrat waren geringere Mengen Chlorothricin sowie ein weiteres Antibioticum enthalten. Über das letztere soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

Durch eine CRAIG-Verteilung über 200 Stufen wurden braune Verunreinigungen abgetrennt, während die aktiven Substanzen als nahezu farbloses amorphes Pulver erhalten wurden. Weder die CRAIG-Verteilung noch die anschliessende Dünnschichtchromatographie liessen erkennen, dass das Antibioticum noch uneinheitlich war. Erst ein chemischer Abbau (s. unten) zeigte, dass es sich noch um ein Gemisch einer chlorhaltigen Verbindung mit geringeren Mengen des entsprechenden chlorfreien Derivates handelte. Auch bei CRAIG-Verteilungen über 600 bzw. 2260 Stufen wurde

keine Trennung der beiden Antibiotica erzielt, doch zeigte eine deutliche Abweichung der experimentellen Kurve von der berechneten das Vorhandensein von zwei Verbindungen an (Fig.1). Obwohl sich das gereinigte Antibioticum aus Methylacetat gut kristallisieren liess, zeigte der bezogen auf das Molekulargewicht von 900–1000 zu kleine und schwankende Chlorgehalt von 2–3% an, dass noch ein Gemisch einer chlorhaltigen und einer chlorfreien Verbindung vorlag.

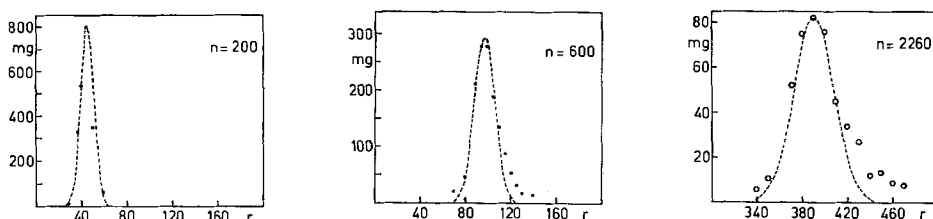


Fig.1. CRAIG-Verteilungen von Chlorothricin über 200, 600 und 2260 Stufen  
 ○ experimentell, ..... berechnet

*Charakterisierung.* Das aus Methylacetat kristallisierte Präparat fiel in farblosen Prismen an. Wegen der schlechten Trennbarkeit von Chlorothricin und Des-chlorothricin war die analytische Untersuchung sehr schwierig. Die im experimentellen Teil angegebenen Analysenzahlen werden daher ohne formelmässige Interpretation wiedergegeben. Die nachfolgend beschriebenen Eigenschaften beziehen sich auf ein Gemisch von Chlorothricin und Des-chlorothricin im Verhältnis von ca. 5:1, wie es bei einer 600stufigen CRAIG-Verteilung und anschliessender Kristallisation anfiel.

Chlorothricin ist eine zweiwertige Säure mit  $pK_{MCS}^*$  5,2 und 8,11. Die durch Mikrotitration gefundenen Äquivalentgewichte von 1021 bzw. 973 für die beiden Stufen sind mit dem durch Dampfdruckosmometrie gefundenen Molekulargewicht von 888 vereinbar. Das UV.-Absorptionsspektrum ist pH-abhängig. In neutraler Lösung (Feinsprit) besitzt es drei Schultern bei 222 nm ( $\log \epsilon = 4,36^1$ ), 260 nm (3,90) und

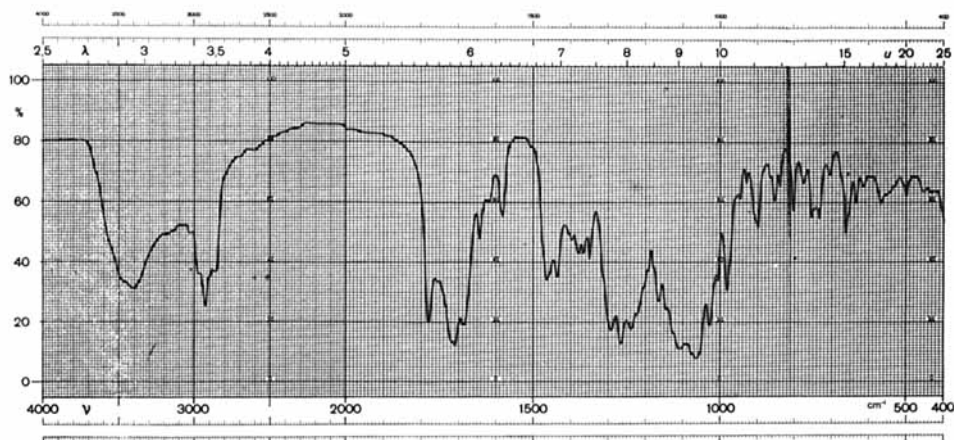


Fig.2. IR-Absorptionsspektrum von Chlorothricin in KBr

<sup>1</sup>) berechnet auf ein Mol.-Gewicht von 950.

281 nm (3,36) sowie eine hohe Endabsorption ( $\log \epsilon_{210 \text{ nm}} = 4,46$ ); in alkalischer Lösung (0,01N NaOH) liegen ein Maximum bei 259 nm ( $\log \epsilon = 4,16$ ) und eine schwache Schulter bei ca. 290 nm vor. Das in KBr aufgenommene IR.-Absorptionsspektrum (Fig. 2) zeigt im  $\nu(\text{CO})$ -Gebiet ein Absorptionsmaximum bei  $1785 \text{ cm}^{-1}$ , eine breite Bande mit Zentrum bei  $1715 \text{ cm}^{-1}$ , die mehreren verschiedenartigen Carbonylgruppen zuzuordnen ist, und schwächere Maxima bei  $1648$  und  $1592 \text{ cm}^{-1}$ , die für aromatische Systeme charakteristisch sind.

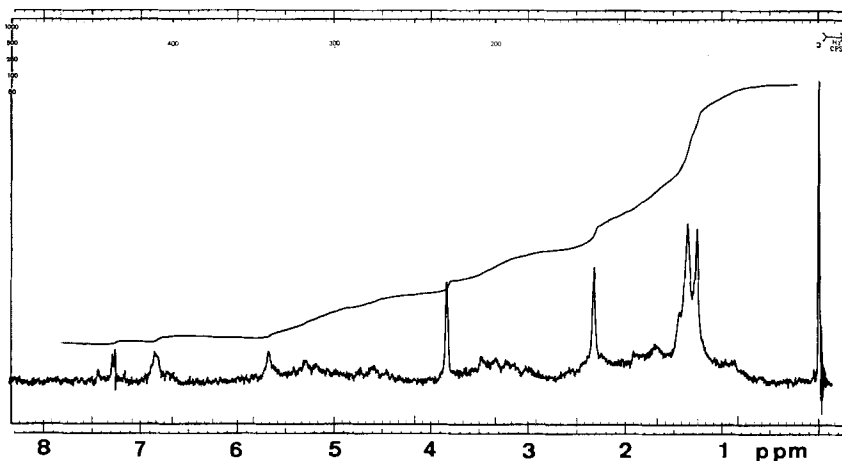


Fig. 3. NMR.-Spektrum von Chlorothricin in  $\text{CDCl}_3$  (60 Mc)

Im NMR.-Spektrum (Fig. 3) fällt zunächst das Signal einer O-Methylgruppe bei  $\delta$  3,84 ppm auf. Ein weiteres Methyl-Singulett bei  $\delta$  2,31 ppm ist auf Grund des Abbaus (s. unten) einer aromatisch gebundenen Methylgruppe zuzuordnen. Starke Signale in der Gegend von 1,2 bis 1,5 ppm mögen teils von Methyl- teils von Methylenprotonen herrühren. Die Signale von ca. 3 Protonen im Gebiet zwischen  $\delta$  6,5 und

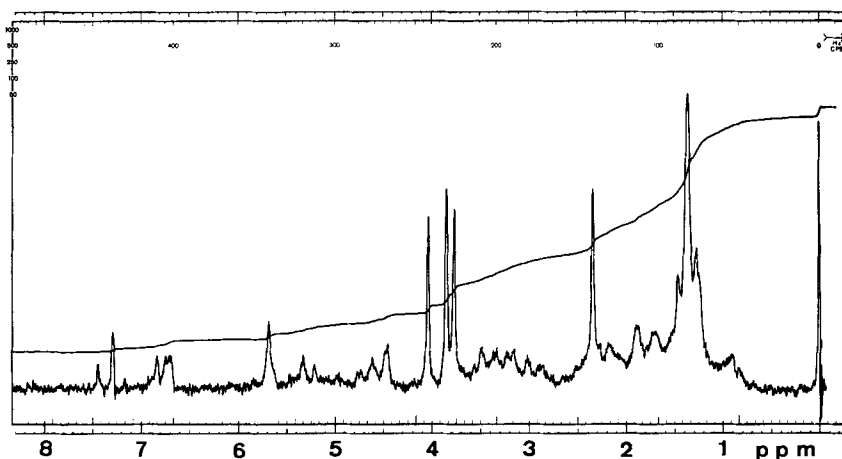


Fig. 4. NMR.-Spektrum von Di-O-methylchlorothricin in  $\text{CDCl}_3$  (60 Mc)

7,5 ppm erscheinen deutlicher in den Spektren von zwei Abbauprodukten wieder und sollen dort näher diskutiert werden. Die Signale von zahlreichen weiteren Wasserstoffatomen sind in schlecht aufgelösten Signalhaufen zwischen  $\delta$  0,8 und 5,8 ppm enthalten und lassen wenig Rückschlüsse auf die Konstitution des Chlorothricins zu.

Bei der Methylierung mit Diazomethan entsteht ein Gemisch von Produkten, von denen die Hauptkomponente mit dem höchsten Rf-Wert als einzige chromatographisch rein gewonnen werden konnte. Gemäss dem NMR.-Spektrum (Fig. 4) sind zu der ursprünglichen zwei neue O-Methylgruppen hinzugekommen (Singulette bei  $\delta$  3,76, 3,84 und 4,05 ppm). Die übrigen Signale unterscheiden sich wenig von denen der freien Säure. Im UV.-Absorptionsspektrum des Methylierungsproduktes fehlt die Schulter bei 260 nm. Dadurch kommt die Absorptionsbande eines Benzolsystems besser zur Geltung:  $\lambda_{max}$  226 nm ( $\log \epsilon = 4,47$ ), 283 nm (3,45), 289 nm (Schulter, 3,43).

Durch Dampfdruckosmometrie wurde ein Molekulargewicht von 960 bestimmt, was mit den durch Titration gefundenen Äquivalentgewichten der freien Säure (s. oben) befriedigend übereinstimmt. Die Analysen des amorphen Methylierungsproduktes sind erneut nicht eindeutig interpretierbar, da der zu geringe Chlorgehalt wieder auf eine Beimengung kleinerer Mengen des Des-chloroderivates schliessen lässt. Eine ungefähre Formel, die sich mit den Analysen verträgt, wäre  $C_{52}H_{67}ClO_{16}$  für das Dimethylderivat, was einer Formel  $C_{50}H_{63}ClO_{16}$  für das Chlorothricin entsprechen würde. Leider liessen sowohl das Chlorothricin wie auch seine Derivate im Massenspektrum nur kleinere Fragmente erkennen, die keinen Rückschluss auf das genaue Molekulargewicht erlaubten. Die Frage nach der exakten Bruttoformel muss daher vorläufig offen bleiben.

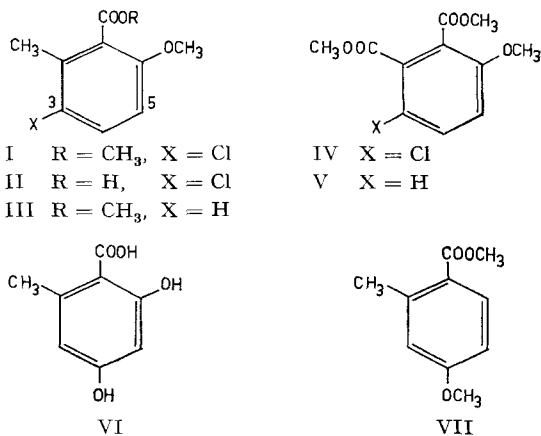
Im Gegensatz zum freien Chlorothricin, dessen Acetylierung sehr uneinheitlich verläuft, gibt das Di-O-methylderivat ein Diacetat, dessen beide Acetylgruppen ein einziges NMR.-Signal zu 6 H bei  $\delta$  2,07 ppm geben. Das in Chloroform aufgenommene IR.-Absorptionsspektrum zeigt im  $\nu(OH)$ -Gebiet keine Absorption. Das Chlorothricin besitzt demnach ausser zwei sauren und zwei acetylierbaren OH-Gruppen keine weiteren Hydroxyle.

Da sich wegen der erwähnten ungünstigen Eigenschaften das Chlorothricin selber nur ungenau charakterisieren lässt, soll es im folgenden durch einige wohldefinierte Abbauprodukte näher beschrieben werden, die auch bereits gewisse Rückschlüsse auf seine chemische Struktur erlauben.

*Chemischer Abbau.* Die Abbaureaktionen wurden mit einem Gemisch von Chlorothricin und Des-chlorothricin (Verhältnis ca. 5:1) durchgeführt. Erste Einblicke in den Bau des aromatischen Teils der Molekel erlaubte ein Abbau mit Kaliumpermanganat. Nach der Veresterung der Oxydationsprodukte mit Diazomethan und chromatographischen Auftrennung wurden vor allem zwei Produkte als farblose Flüssigkeiten mit den Bruttoformeln  $C_{10}H_{11}ClO_3$  und  $C_{10}H_{12}O_3$  erhalten. Von den beiden Verbindungen, die im ungefähren Verhältnis 5:1 anfielen, stammte die erste aus dem Chlorothricin, die zweite aus dem Des-chlorothricin. Das chlorhaltige Abbauprodukt ging bei der katalytischen Hydrierung in das chlorfreie über, wodurch ihr struktureller Zusammenhang gegeben ist.

Die Verbindung  $C_{10}H_{11}ClO_3$  (I) gibt sich durch ihr UV.-Absorptionsspektrum als Benzoessäurederivat zu erkennen:  $\lambda_{max}$  227 und 288 nm,  $\log \epsilon = 3,94$  bzw. 3,40. Das

NMR.-Spektrum zeigt die Anwesenheit von 2 OCH<sub>3</sub>-Gruppen, einer aromatisch gebundenen Methylgruppe und zwei zueinander *o*-ständigen Wasserstoffatomen an. Bei der alkalischen Hydrolyse wurde die entsprechende freie Säure vom Smp. 151–152,5°,



C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>ClO<sub>3</sub> (II), erhalten, deren NMR.-Spektrum die Anwesenheit einer O-Methylgruppe anzeigt. Das Abbauprodukt I ist demnach ein Chlor-methoxy-methyl-benzoesäure-methylester. Der chlorfreie Methylester (III),  $\lambda_{max}$  281 nm,  $\log \epsilon = 3,38$ , gab ein NMR.-Spektrum mit einem Arylmethyl-Signal ( $\delta$  2,30 ppm), zwei O-Methylsignalen ( $\delta$  3,82 und 3,92 ppm) und einer Signalgruppe entsprechend drei aromatisch gebundenen Wasserstoffatomen bei  $\delta$  6,7 bis 7,4 ppm (Fig. 5). Diese letztere Signalgruppe lässt *o*-Kopplungen ( $J$  ca. 8 cps) neben kleineren Kopplungskonstanten erkennen. Aus bio-

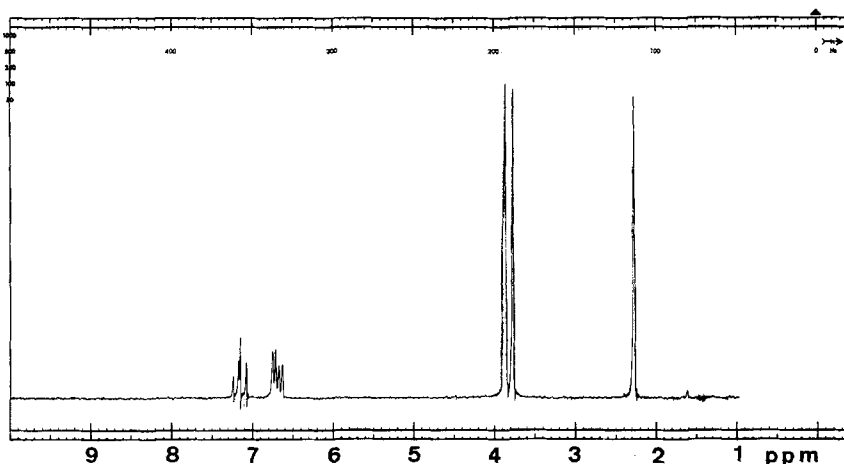


Fig. 5. NMR.-Spektrum von 2-Methoxy-6-methyl-benzoessäure-methylester in CDCl<sub>3</sub> (100 Mc)

genetischen Gründen dürfte ein konstitutioneller Zusammenhang dieses Abbauproduktes mit der Orsellinsäure (VI) vermutet werden. Es standen demnach die beiden Konstitutionsformeln III und VII im Vordergrund. Ein nach der Vorschrift von

BARBIER [3] hergestelltes Vergleichspräparat des Esters VII zeigte IR.- und NMR.-Spektren, die sich von denen des Abbauproduktes deutlich unterschieden. Hingegen erwies sich der 6-Methoxy-2-methyl-benzoesäure-methylester (III), hergestellt nach ELIEL u. Mitarb. [4] in allen Eigenschaften als identisch mit dem chlorfreien Abbauprodukt.

Die beiden aromatisch gebundenen Wasserstoffatome im chlorhaltigen Abbauester I geben im NMR.-Spektrum eine  $AB$ -Signalgruppe (Tabelle 1) mit  $J_{AB}$  ca. 9 cps, sie liegen demnach zueinander  $o$ -ständig, für die Stellung des Chloratoms kommen nur die C-Atome 3 und 5 (Formel I) in Betracht. Ein Entscheid liess sich auf spektroskopischem Wege erbringen, nachdem die Methylgruppe zur Carboxylgruppe oxydiert und mit Diazomethan verestert worden war. Der dabei erhaltene Ester IV zeigte im Gebiet um  $\delta$  7 ppm wiederum eine  $AB$ -Signalgruppe, deren Signale gegenüber dem Ester I um 0,13 bzw. 0,26 ppm nach tieferem Feld verschoben waren (Tabelle 1). Diese Ver-

Tabelle 1. NMR.-Signale der aromatisch gebundenen Protonen der Methylester I und IV

	$\delta H-4$	$\delta H-5$	$J_{AB}$
Methylester I	7,30	6,72	9 cps
Dimethylester IV	7,43	6,98	9 cps
Verschiebung	+ 0,13	+ 0,26	

schiebungen entsprechen Wasserstoffen in  $m$ - bzw.  $p$ -Stellung zur neu entstandenen Carbomethoxygruppe. Bei den isomeren 5-Chlorverbindungen wäre für ein Wasserstoff an C-3 eine Verschiebung von ca. + 0,8 bis 1,0 ppm zu erwarten gewesen. Eine derartige für  $o$ -ständige Wasserstoffe charakteristische Verschiebung wurde tatsächlich bei den chlorfreien Analoga III und V beobachtet (Tabelle 2).

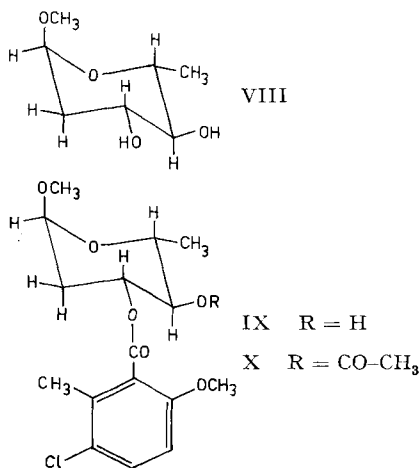
Tabelle 2. NMR.-Signale der aromatisch gebundenen Wasserstoffe der Methylester III und V

	$\delta H-3$	$\delta H-4$	$\delta H-5$
Methylester III	6,76	7,22	6,80
Dimethylester V	7,62	7,42	7,15
Verschiebung	+ 0,86	+ 0,20	+ 0,35

Grössere Bruchstücke wurden bei der säurekatalysierten Methanolyse des Chlorothricins erhalten. Ein erstes Hauptprodukt, Methanolyseprodukt B, wurde als neutrales viskoses Öl isoliert und erwies sich trotz scheinbarer chromatographischer Einheitlichkeit wiederum als Gemisch eines chlorhaltigen Abbauproduktes,  $C_{16}H_{21}ClO_6$ , mit geringeren Mengen seines chlorfreien Analogons. Das Acetylderivat der Verbindung kristallisierte. Durch mehrmaliges Umkristallisieren wurde der chlorfreie Anteil weitgehend eliminiert. Das einheitliche Produkt vom Smp.  $141^\circ$  gab Analysen, die auf die Bruttoformel  $C_{18}H_{23}ClO_7$  hinwiesen. Damit im Einklang sind die beiden Molekülonen im Massenspektrum mit  $m/e$  386 und 388 (Intensitätsverhältnis 3:1).

Das Methanolyseprodukt B ist gemäss seinem IR.-Absorptionsspektrum ( $\nu_{max}$   $1735\text{ cm}^{-1}$ , Chloroform) ein Ester und gibt bei der alkalischen Hydrolyse die oben beschriebene 3-Chlor-6-methoxy-2-methyl-benzoesäure (II) neben dem chlorfreien Analogon (III) und ein Methylglykosid, das sich gemäss IR.- und NMR.-Spektrum und auf Grund der optischen Drehung als identisch erwies mit dem  $\alpha$ -Methyl-2-

desoxy-D-rhamnosid (VIII), das wir kürzlich als Abbauprodukt der Venturicide A und B erhalten haben [5]. Das Methanolysenprodukt B ist demnach ein Ester der substituierten Benzoesäure II mit dem Methylglykosid VIII. Die Stellung des Aroylrestes am Zucker sowie eine Bestätigung für die Konstitution und Konfiguration des Zuckers ergab sich aus den NMR.-Spektren des Methanolysenproduktes B (IX) und seines Acetylderivates X. Die Zuordnung der Signale gemäss Tabelle 3 erfolgte nach Spinkopplungsexperimenten ohne Schwierigkeiten.



Die Beziehung der Signale der CH<sub>2</sub>-Gruppe zu den Signalen des Wasserstoffs an C-1 bei  $\delta$  4,78 bzw. 4,81 ppm und des Wasserstoffs an C-3 ( $\delta$  5,35 bzw. 5,55 ppm) sowie das Vorliegen einer CH<sub>3</sub>-CH-O-Gruppe zeigen, dass der Zucker eine 2,6-Dideoxyhexose ist. Die Kopplungskonstanten  $J_{2a,3} = 11,5$ ,  $J_{3,4} = 9,5$  und  $J_{4,5} = 9,5$  cps beweisen die axiale Lage der Wasserstoffe an C-3, C-4 und C-5 und damit die *arabino*-Konfiguration an den drei asymmetrischen Kohlenstoffatomen. Als Folge der Acetylierung wird das Signal von H-4 um über eine  $\delta$ -Einheit nach tieferem Feld verschoben, während das Signal von H-C(3) kaum verändert wird. Daraus geht hervor, dass das Sauerstoffatom an C-3 die Aroylgruppierung trägt, während an C-4 die acetylierbare Hydroxylgruppe steht.

Die kleinen Kopplungskonstanten  $J_{1,2a} = 3,5$  cps und  $J_{1,2e} = 1,5$  cps zeigen ferner, dass ein einheitliches  $\alpha$ -Glykosid mit axialer Methoxylgruppe vorliegt. Auch das Methylglykosid VIII, das durch alkalische Hydrolyse des Esters IX erhalten wurde, zeigt für das Proton an C-1 im NMR.-Spektrum nur ein einziges Signal in Form eines Doppeldoublets mit Kopplungskonstanten von ca. 3 und 1 cps; es handelt sich demnach ebenfalls um das reine  $\alpha$ -Methylglykosid. Seine spezifische Drehung,  $[\alpha]_{578} = +150^\circ$  ( $c = 0,45$  in Aceton) stimmt nach Richtung und Betrag überein mit den Drehwerten der Glykoside aus Venturicin A und B [5]. Der Zucker gehört demnach der D-Reihe an. Die 2-Desoxy-D-rhamnose (= D-Chromose C = D-Olivose) wurde schon früher mehrmals als Baustein anderer Antibiotica aus Actinomyceten nachgewiesen [5] [6] [7], u. a. im Avilamycin [8] ebenfalls mit einer chlorhaltigen aromatischen Carbonsäure verestert. Unter dem Namen Canarose ist sie als Baustein von Digitalis-Glykosiden mehrmals beschrieben [9] und auch synthetisch hergestellt worden [10].

Tabelle 3. NMR.-Spektren des Methanolyseproduktes B (IX) und seines Acetylriovates in  $CDCl_3$ 

Glykosid IX (60 Mc)		Acetyl-glykosid X (100 Mc)		Entkopplung durch Einstrahlung bei		Zuordnung		
$\delta$	Aufspaltung	Integ.	$\delta$	Aufspaltung	Integ.	$\delta$	Aufspaltung des entkoppelten Signals	
1,34	$d, J = 6,5$	3H	1,21	$d, J = 6,5$	3H	3,90	$s$	H-C(6) ( $CH_3$ )
-	-	-	2,06	$s$	3H	-	-	$CH_3COO-$
2,32	$s$	3H	2,23	$s$	3H	-	-	$CH_3-Ar$
3,36	$s$	3H	3,34	$s$	3H	-	-	$CH_3O-C(1)$
3,82	$s$	3H	3,74	$s$	3H	-	-	$CH_3O-Ar$
1,82	$m, J_{2a,2e} = 12,5$ $J_{2a,3} = 11,5$ $J_{2a,1} = 3,5$	1H	1,88	$m, J_{2a,2e} = 12,5$ $J_{2a,3} = 11,5$ $J_{2a,1} = 3,5$	1H	5,55	vereinfachtes $m$	H-C(2a)
2,30	$m, J_{2e,2a} = 12,5$ $J_{2e,3} = 5,5$ $J_{2e,1} = 1,5$	1H	2,36	$m, J_{2e,2a} = 12,5$ $J_{2e,3} = 5,5$ $J_{2e,1} = 1,5$	1H	5,55	$dd, J = 12,5$ bzw. 1,5	H-C(2e)
2,78	$d, J = 3,5$	1H	-	-	-	-	-	OH
3,1-4,0	$m$ , teilweise überdeckt von $OCH_3$ -Signalen	2H	3,90	$m, J_{5,6} = 6,5$ $J_{5,4} = 9,5$	1H	4,81	$q, J = 6,5$ teilweise überdeckt von $OCH_3$ -Signalen	H-C(5)
4,78	$dd, J_{1,2a} = 3,5$ $J_{1,2e} = 1,5$	1H	4,81	$m$ , Überlagerung von 2 Signalen, erkennbare $J$ : $9,5-3,5-1,5$	2H	5,55	-	H-C(1) + H-C(4)
5,35	$m, J_{3,2a} = 11,5$ $J_{3,2e} = 5,5$ $J_{3,4} = 9,5$	1H	5,55	$m, J_{3,2a} = 11,5$ $J_{3,2e} = 5,5$ $J_{3,4} = 9,5$	1H	4,81	-	H-C(3)
6,70	$d, J = 8,5$	1H	6,67	$d, J = 8,5$	1H	-	-	Ar-H
7,30	$d, J = 8,5$	1H	7,27	$d, J = 8,5$	1H	-	-	Ar-H



Ein zweites Hauptprodukt der methanolytischen Spaltung von Chlorothricin, das Methanolyseprodukt C, wurde in Form farbloser Kristalle,  $C_{30}H_{38}O_8$  (XI), erhalten, die offenbar das Aglykon oder einen wesentlichen Teil des Aglykons darstellen. Die Verbindung ist eine einwertige Säure,  $pK_{MCS}^*$  5,00, Äquivalentgewicht 538. Das UV.-Absorptionsspektrum zeigt ein Maximum bei 225 nm ( $\log \epsilon = 4,22$ ) und eine Schulter bei ca. 260 nm (3,76).

In alkalischer Lösung besitzt sie ein hohes Maximum bei 258 nm ( $\log \epsilon = 4,23$ ). Im NMR.-Spektrum (Fig. 6) fällt ein Methoxysignal bei  $\delta$  3,78 ppm auf. Da die einzige O-Methylgruppe des Chlorothricins im 3-Chlor-6-methoxy-2-methyl-benzoessäure-Rest enthalten ist, muss die Methoxylgruppe des Methanolyseprodukts C infolge der Methanolyse neu eingeführt worden sein. Im Gebiet von  $\delta$  5 bis 7 ppm finden wir

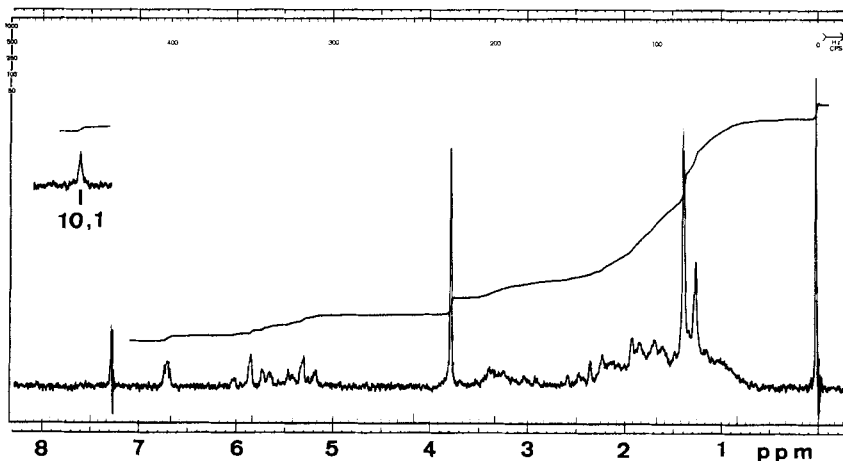


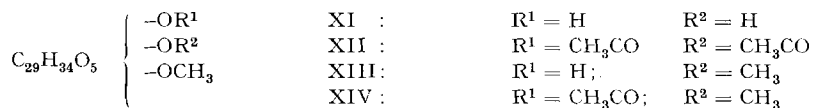
Fig. 6. NMR.-Spektrum von Methanolyseprodukt C in  $CDCl_3$  (60 Mc)

Signale von 4 Wasserstoffatomen an ungesättigten Zentren. Die beiden scharfen Signale bei  $\delta$  1,37 und 1,23 ppm lassen sich zunächst nicht eindeutig zuordnen. Sie können sowohl einer Anhäufung von Methylengruppen wie auch Methylgruppen im Wirkungsbereich von Sauerstoffatomen entsprechen. Das IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform zeigt im  $\nu(CO)$ -Gebiet drei Maxima bei 1765, 1710 und 1683  $cm^{-1}$  für mehrere verschiedenartige Carbonylgruppen.

Die Verbindung XI gibt ein kristallines Diacetat,  $C_{34}H_{42}O_{10}$  (XII), dessen Bruttoformel durch das Massenspektrum ( $M^+ = 610$ ) gesichert ist. Die NMR.-Signale der Acetylwasserstoffe liegen bei  $\delta$  2,07 und 2,26 ppm. Im übrigen ist das Spektrum sehr ähnlich dem der nicht acetylierten Verbindung XI. Das  $\nu(CO)$ -Gebiet des IR.-Absorptionsspektrums ist recht komplex mit Maxima bei 1792, 1760, 1735 und 1700  $cm^{-1}$ , das  $\nu(OH)$ -Gebiet ist leer. Das Fehlen einer sauren Gruppe im Acetylierungsprodukt spricht dafür, dass im Methanolyseprodukt XI eine enolische OH-Gruppe vorliegt.

Ein dem Methanolyseprodukt C (XI) entsprechendes methyliertes Abbauprodukt, das Methanolyseprodukt D (XIII), wurde neben dem Glykosidester IX erhalten, wenn die Methanolyse mit dem Di-O-methylchlorothricin durchgeführt wurde. Das

rohe Methanolysegemisch wurde acetyliert und die Produkte in Form der Acetate isoliert. Das Acetat XIV des Methanolyseprodukts D,  $C_{33}H_{42}O_9$ , besitzt neben der ursprünglichen eine zweite O-Methylgruppe (Singulett bei  $\delta$  4,04 und 3,76 ppm). Das Signal der einzigen O-Acetylgruppe liegt bei  $\delta$  2,08 ppm. Der Rest des Spektrums deckt sich weitgehend mit dem der Abbauprodukte XI und XII. Die Beziehungen der vier Produkte XI, XII, XIII und XIV ist in der nachstehenden Partialformel ausgedrückt:



Die beiden gut charakterisierten Methanolyseprodukte B,  $C_{16}H_{21}ClO_6$ , und C,  $C_{35}H_{38}O_8$ , geben nach Abzug einer Molekel Methanol (für die Glykosidbindung) und von  $CH_2$  (für die neue  $OCH_3$ -Gruppe) zusammen eine Bruttoformel  $C_{44}H_{53}ClO_{13}$  mit einem berechneten Molekulargewicht von 824, das noch um etwa 100 bis 150 Einheiten tiefer liegt als das experimentell bestimmte (s. oben). Es ist daher wahrscheinlich, dass beim Abbau ein kleinerer Baustein nicht erfasst wurde. Weitere Arbeiten zur Konstitutionsaufklärung des Aglykons sind im Gange.

*Biologische Wirkung.* Da das Chlorothricin nur im Test auf chemisch definierten Nährmedien eine antibiotische Wirkung zeigt, kann nicht in der gewohnten Weise ein Wirkungsspektrum bestimmt werden, da nur wenige ausgesuchte Bakterienstämme auf synthetischen Nährböden gut wachsen. GRAM-positive Keime werden unter den angegebenen Bedingungen gehemmt, GRAM-negative nicht. Für mehrere bekannte Antibiotica, die auf definierten Nährböden wesentlich besser wirken als auf komplexen, konnte diese Erscheinung auf ein Metaboliten-Antimetaboliten-Verhältnis zurückgeführt werden, so z. B. für das 5-Azacytidin [11] [12], das  $\alpha$ -Dehydrobiotin [13], die L-2-Amino-4,4-dichlor-buttersäure [14], das Psicofuranin [15] [16] und verschiedene andere Purinantibiotica.

Beim Chlorothricin konnte keine einzelne Verbindung gefunden werden, die seine wachstumshemmende Wirkung aufzuheben vermag. Nach vorläufigen Versuchen zu beurteilen geht das Chlorothricin mit Lipoproteinen eine Bindung ein, was das Ausbleiben einer Wirkung auf Fleischextrakt enthaltenden Nährböden zu erklären vermag.

Die Fermentationen wurden in einer von der Stiftung Volkswagenwerk zur Verfügung gestellten Apparatur «FERMA-CELL» New Brunswick durchgeführt. Wir danken der Firma VOLKSWAGENWERK für die grosszügige Hilfe. Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Alle Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt und sind nicht korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden auf einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, die UV.-Absorptionsspektren auf einem PERKIN-ELMER-Spektrometer, Modell 137 aufgenommen. Für die Aufnahme der NMR.-Spektren wurde ein VARIAN-Spektrometer, Modell A 60, verwendet. Spinnetkopplungsexperimente wurden mit dem VARIAN-Spektrometer HA 100 durchgeführt. Chemische Verschiebungen sind in  $\delta$ -Einheiten gegenüber Tetramethylsilan als internem Standard, Kopplungskonstanten ( $J$ ) in cps angegeben.  $s$  = Singulett,  $d$  = Dublett,  $dd$  = Doppeldublett,  $t$  = Triplet,  $m$  = Multiplet.

Dünnschichtchromatogramme (TLC) wurden mit Kieselgel-Fertigplatten F<sub>254</sub> der Firma MERCK ausgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit Joddampf bei Zimmertemperatur. Für die präparative Chromatographie verwendeten wir Kieselgel MERCK, 0,05–0,2 mm. Die Trennung kleiner Substanzmengen wurden mit vierstufigen Multibore-Kolonnen [17] durchgeführt.

*Beschreibung des Stammes.* Der Chlorothricin bildende Actinomycetenstamm, Tü 99, wurde aus einer Bodenprobe aus Argentinien isoliert. Er ist der Gattung *Streptomyces* zuzuordnen und ist durch folgende artbestimmenden Merkmale gekennzeichnet:

1. Sporen zylindrisch bis ellipsoidisch, 0,5–0,9 mal 0,9–1,5  $\mu$  gross, mit glatter Sporenoberfläche (Elektronenmikroskopie).
2. Das Luftmycel ist anfangs weiss und wird später hellgrau bis aschgrau (*cinereus*).
3. Die Sporenketten sind monopodial verzweigt, die Hauptachse gerade bis wenig gekrümmt, Seitenzweige leicht gewellt, gelegentlich als Büschel aus der Hauptachse entspringend.
4. Auf Pepton-Eischnagar bildet der Stamm ein melaninartiges Pigment.
5. Das Substratmycel ist ungefärbt bis leicht bräunlich.

Damit stimmt der Stamm Tü 99 in allen artbestimmenden Merkmalen mit dem Lectotypus IMRU 3435 von *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN *et* WOODRUFF) WAKSMAN *et* HENRICI 1948 überein [2].

*Fermentierung; Isolierung der Antibiotica.* Der Stamm Tü 99 wurde in gut belüfteter Submerskultur 48 Std. bei 27° auf der folgenden Nährlösung angezogen: Sojamehl vollfett: 2%; Mannit (techn.) 2%. Als Impfmateriale dienten 10% einer gleich alten, unter den gleichen Bedingungen angezogenen Submerskultur. Nach 48 Std. wurde unter Zusatz von 2% Hyflo-Supercel filtriert und das Filtrat und der Rückstand getrennt weiterverarbeitet.

Der Filtrerrückstand, der die Hauptmenge Chlorothricin enthielt, wurde dreimal mit Methanol ausgezogen. Die Extrakte wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer eingedunstet und nach Zusatz von Wasser auf pH 5 angesäuert. Beim dreimaligen Extrahieren mit Äthylacetat ging die Aktivität vollständig in die organische Phase über. Diese wurde im Vakuum eingedunstet und der Rückstand zwischen Petroläther und 98-proz. wässrigem Methanol verteilt. Im Petroläther waren grössere Mengen inaktives Öl enthalten. Aus der methanolischen Phase wurde die Hauptmenge Rohchlorothricin als braunes zähes Öl erhalten.

Das Kulturfiltrat wurde mit Salzsäure auf pH 5 eingestellt und dreimal mit Äthylacetat extrahiert. Die eingetrockneten Extrakte wurden in einem Lösungsmittelsystem aus 2 T. Chloroform, 3 T. Tetrachlorkohlenstoff, 4 T. Methanol und 1 T. Wasser einer 70-stufigen CRAIG-Verteilung unterzogen. Aus den Stufen 13–15 wurden noch geringere Mengen Rohchlorothricin gewonnen. In den Stufen 33–44 fand sich eine weitere aktive Komponente vor, die in den Extrakten des Filtrerrückstandes nicht enthalten war. Über dieses Antibioticum wird später berichtet.

*Reinigung der Antibiotica.* 55,4 g Rohchlorothricin wurden in 1000 ml Essigester gelöst und dreimal mit je 300 ml 2N Sodaauszug ausgeschüttelt. Die Sodaauszüge wurden bei 0° mit ca. 6N Salzsäure angesäuert und mit 600 ml Essigester ausgezogen. Der mit Wasser gewaschene und mit Natriumsulfat getrocknete Extrakt gab beim Eindampfen 23,3 g saure Produkte als gelbliche, halbfeste Masse. Die Rohsäuren wurden in einem Lösungsmittelsystem aus 4 l Methanol, 1 l Wasser, 3 l Tetrachlorkohlenstoff und 2 l Chloroform einer 200-stufigen CRAIG-Verteilung unterzogen. Aus den Fraktionen 30 bis 60 wurden durch Eindampfen im Vakuum 16,4 g nahezu farbloses festes Produkt erhalten (vgl. Fig. 1). Für Abbaueversuche wurde in der Regel von diesem Material eingesetzt.

8,4 g dieses Produktes wurden mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch über 600 Stufen verteilt (Fig. 1, Mitte). Die Aufarbeitung der Fraktionen 80–125 gab 7,1 g farbloses Pulver, das in 20 ml siedendem Methylacetat gelöst wurde. Nach längerem Stehen bei 20° schied sich 5,6 g farblose Kristalle ab, die nach dreimaligem Umkristallisieren bei 206° schmolzen. Im Nachfolgenden sind Analysen verschiedener Präparate wiedergegeben.

Gef. C 62,30; 62,91; 63,96; 60,26 H 6,73; 6,72; 6,60; 6,82 Cl 3,05; 2,83; 2,19%

Mikrotitration in Methylcellosolve:  $pK_{MCS}^*$  5,2; 8,11; Aeq.-Gew. 1021; 973. Mol.-Gew. durch Dampfdruckosmometrie in Äthylacetat 888.  $[\alpha]_D^{20} = +1,5^\circ$  ( $c = 1\%$  in Chlf.). IR.-Absorptionsspektrum in KBr: Fig. 2. NMR.-Spektrum in  $CDCl_3$ : Fig. 3. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 222 nm (4,36), 260 nm (3,90), 281 nm (Schulter, 3,36). UV.-Absorptionsspektrum in 0,01N alkohol. Natronlauge:  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 259 nm (4,17), 290 nm (flache Schulter).

4,97 g Material aus einer 600-stufigen CRAIG-Verteilung wurden erneut über 2260 Stufen verteilt (Fig. 1, rechts). Die Fraktionen wurden in drei Gruppen aufgetrennt, die separat wie beschrieben aufgearbeitet wurden. Aus den Fraktionen 350-390 wurden 1,7 g farbloses Pulver erhalten:

Gef. C 63,34 H 7,15 Cl 2,06%

Die Fraktionen 391-418 gaben 1,8 g Substanz:

Gef. C 63,91 H 7,25 Cl 1,18%

Aus den Fraktionen 419-460 wurde ein nahezu chlorfreies Präparat mit  $pK_{MCS}^*$  5,14 und 7,72 erhalten:

Gef. C 66,08 H 8,10 Cl 0,31%

Zu einer Lösung von 200 mg des Präparates aus den Fraktionen 350-390 in 40 ml Alkohol gelöst wurden bei Siedehitze 10 ml Wasser gegeben. Nach 2 Wochen Stehen bei Raumtemperatur hatten sich 140 mg wasserklare Prismen abgeschieden, die beim Trocknen im Hochvakuum (36 Std., 45°) zu einem farblosen amorphen Pulver zerfielen. Auf Grund der Analysen enthielt das Präparat aber noch reichlich Wasser.

*Di-O-methylchlorothricin*. 32,2 g rohes Chlorothricin aus 100 l Kultur wurden in 200 ml Methanol gelöst, mit 200 ml Äther verdünnt und bei 0° tropfenweise mit 400 ml ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 30-min. Stehen bei Raumtemperatur wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand an 600 g Kieselgel chromatographiert. Mit 2 l Chloroform und 2 l Chloroform-Aethylacetat 8:2 wurden 8,3 g gelbliche ölige Verunreinigungen abgetrennt. Mit 2 l Chloroform-Aethylacetat 1:1 wurden 5,18 g Di-O-methylchlorothricin als chromatographisch nahezu einheitliches, aber noch stark gelb gefärbtes Pulver erhalten. Mit Äthylacetat wurden noch 774 bzw. 413 mg von zwei Nebenkomponenten erhalten, die nicht näher charakterisiert wurden.

Zur Analyse wurde das Di-O-methylderivat nochmals an der 100-fachen Menge Kieselgel chromatographiert und das farblose Eluat aus Aceton-Petroläther umgefällt. Der amorphe pulverige Niederschlag wurde drei Tage im Hochvakuum getrocknet. Smp. 155-165°,  $[\alpha]_D = -5,5^\circ$  ( $c = 0,5$  in Chlf.). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 228 nm (4,47), 283 nm (3,45), 289 nm (Schulter, 3,43). Das in KBr aufgenommene IR.-Absorptionsspektrum zeigt u. a. Maxima bei 1780, 1762, 1723, 1690, 1648 und 1590  $cm^{-1}$ .

Gef. C 64,96 H 7,05 Cl 3,11% Mol.-Gew. 960<sup>2)</sup>

Die gleiche Verbindung war Hauptprodukt, wenn reines Chlorothricin-Des-chlorothricin-Gemisch mit Diazomethan methyliert wurde.

*Di-O-acetyl-di-O-methyl-chlorothricin*. 170 mg des Methylierungsproduktes wurden mit je 2,5 ml Pyridin und Essigsäureanhydrid 20 Std. bei Raumtemperatur umgesetzt und der Eindampfdruckstand an 15 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 9:1 wurden 157 mg chromatographisch einheitliches amorphes Acetylderivat erhalten. Durch Umfällen aus Aceton-Petroläther erhielt man ein amorphes Pulver. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 225 nm (4,38), 281 nm (3,27), 287 nm (Schulter, 3,25). Das IR.-Absorptionsspektrum in Chlf. zeigt mehrere Maxima im  $\nu(CO)$ -Gebiet, dagegen keine Absorption im  $\nu(OH)$ -Gebiet. Das NMR.-Spektrum in  $CDCl_3$  zeigt die Anwesenheit von 3  $OCH_3$ -, einer  $Ar-CH_3$ - und 2 O-Acetylgruppen an: Singulette bei 2,07 (6 H), 2,25 (3 H), 3,77 (3 H), 3,80 (3 H) und 4,03 ppm (3 H).

*Oxydation von Chlorothricin mit Kaliumpermanganat*. 1 g Chlorothricin in 50 ml 10-proz. Natronlauge wurde in kleinen Portionen im Verlaufe von 6 Std. mit einer Lösung von 7,5 g Kaliumpermanganat in 100 ml Wasser versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Der Überschuss des Oxydationsmittels wurde mit etwas Methanol zersetzt und die Lösung vom Braenstein abfiltriert. Das mit Salzsäure angesäuerte Filtrat wurde mit Äthylacetat ausgezogen und gab 350 mg rohes Säuregemisch. Das mit Diazomethan hergestellte Gemisch der Methylester enthielt gemäss Dünnschichtchromatographie (abs. Chloroform als Fließmittel, Entwicklung mit Jod-dampf) vier Komponenten, die an einer Säule aus 50 g Kieselgel getrennt wurden.

Mit abs. Chloroform wurden 100 mg einheitlicher Methylester I erhalten, der durch Destillation im Hochvakuum bei ca. 110° gereinigt wurde. Massenspektrum:  $M^+ = 214$  ( $C_{10}H_{11}ClO_3$  ber. 214);  $I_{214}:I_{216} = 3:1$  entsprechend der Anwesenheit von 1 Cl-Atom. Weitere charakteristische Signale bei  $m/e$  199 ( $M-15$ ), 183 ( $M-31$ ). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 227 nm (3,94),

<sup>2)</sup> Dampfdruckosmometrie in Äthylacetat.

288 nm (3,40). NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  2,28 ppm (s, 3 H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 3,80 ppm (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,92 ppm (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,73 ppm (d,  $J = 8,5$ , 1 Ar-H), 7,30 ppm (d,  $J = 8,5$ , 1 Ar-H). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu(\text{CO})$  1725  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{Ar})$  1583  $\text{cm}^{-1}$ , keine OH-Banden

Die anschliessenden 32 mg Eluat waren chromatographisch einheitlicher Methyl ester III, der durch Destillation (Sdp. ca.  $70^\circ/0,1$  Torr) als farblose Flüssigkeit erhalten wurde. Massenspektrum:  $M^+ = 180$  ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$  ber. 180). UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{\text{max}}$  281 nm,  $\log \epsilon = 3,38$ . NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ : Fig. 5. Die Verbindung war nach IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit dem Methylierungsprodukt der nach ELIEL [4] hergestellten 6-Methyl-salicylsäure (s. unten).

45 mg flüssiges Eluat, das mit Chloroform-Äthylacetat 9:1 erhalten wurde, erwies sich nach dem NMR.-Spektrum als Gemisch mehrerer Substanzen und wurde nicht weiter untersucht.

*3-Chlor-6-methoxy-2-methyl-benzoessäure (II)*. 61 mg des Methyl esters I wurden in 5 ml 1N alkalischer Natronlauge 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Das mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch gab beim Ausschütteln mit Äther noch 3 mg Neutralteil. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase wurden mit Äther 49 mg farblose Kristalle erhalten, die nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther und Sublimation bei  $151\text{--}152,5^\circ$  schmolzen. Mikrotitration in 80-proz. Methylcellosolve;  $pK^* = 5,61$ .

$\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_3$	Ber. C 53,88	H 4,52	Cl 17,67%	Mol.-G. 201
	Gef. „ 53,90	„ 4,48	„ 17,58%	Äq.-G. 204 (Titrl.)

*3-Chlor-6-methoxy-phtalsäure-dimethylester (IV)*. 93 mg Methyl ester I wurden in 4 ml 7-proz. Kalilauge mit 200 mg Kaliumpermanganat 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wurde mit Salzsäure angesäuert und der Braunstein mit Natriumhydrogensulfit reduziert. Die Lösung wurde im Vakuum stark eingengt, worauf im Verlauf einiger Stunden 54 mg der Säure II auskristallisierten. Die Mutterlaugen wurden abgedampft und der Rückstand mehrmals mit Chloroform ausgezogen. Durch Eindampfen der Chloroformlösungen erhielt man 40 mg festen Rückstand, der mit Diazomethan verestert wurde. Durch Chromatographie an 7 g Kieselgel erhielt man 9 mg Ausgangsmaterial (Rf 0,74, mit Chloroform-Äthylacetat 97:3) und 28 mg *Dimethylester IV* (Rf 0,52), der nach Sublimation im Hochvakuum bei  $99\text{--}100^\circ$  schmolz. NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  3,87 ppm (s, 3 H), 3,88 ppm (s, 3 H), 3,92 ppm (s, 3 H), 6,98 ppm (d,  $J = 9$ , 1 H), 7,43 ppm (d,  $J = 9$ , 1 H). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{\text{max}}$  u. a. 1728, 1020, 962, 926, 841  $\text{cm}^{-1}$ .

*3-Methoxy-phtalsäure-dimethylester (V)*. 89 mg 6-Methoxy-2-methyl-benzoessäure-methylester wurden in gleicher Weise wie der Methyl ester I mit Kaliumpermanganat oxydiert und der Braunstein durch Reduktion mit Natriumhydrogensulfit entfernt. Die Lösung wurde darauf im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit Methylacetat mehrmals ausgezogen. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels blieben 87 mg rohe Säuren, die mit Diazomethan verestert wurden. Durch Chromatographie an 8,5 g Kieselgel wurden 45 mg Ausgangsmaterial und 25 mg Oxydationsprodukt erhalten; nach Sublimation im Hochvakuum Smp.  $68\text{--}70^\circ$  [18]. NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  3,90 ppm (s, 3 H), 3,97 ppm (s, 3 H), 3,92 ppm (s, 3 H), 7,15 ppm (dd,  $J_1 = 8$ ,  $J_2 = 2$ , 1 H), 7,43 ppm (t,  $J = 8$ , 1 H), 7,65 ppm (dd,  $J_1 = 8$ ,  $J_2 = 2$ , 1 H). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{\text{max}}$  u. a. 1730, 962, 883, 834  $\text{cm}^{-1}$ .

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$	Ber. C 58,92	H 5,40%	Gef. C 59,00	H 5,34%
--	--------------	---------	--------------	---------

*6-Methoxy-2-methyl-benzoessäure-methylester (III) durch Hydrierung des Chloresters I*. 209 mg 3-Chlor-6-methoxy-2-methyl-benzoessäure-methylester aus dem Chlorothricin-Abbau wurden in 15 ml 0,1N methanolischer Kalilauge in Gegenwart von 320 mg 5-proz. Palladiumkohle in einer Wasserstoffatmosphäre intensiv gerührt. Nach 15 Min. und Aufnahme von 0,9 Mol.-Äqu. Wasserstoff kam die Hydrierung zum Stillstand. Darauf wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, angesäuert und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen und Eindampfen der Lösung blieb ein Rückstand von 153 mg, der mittels ätherischer Diazomethanlösung verestert wurde. Durch Chromatographie des Produktes an 25 g Kieselgel wurden mit abs. Chloroform als Eluierungsmittel zunächst 32 mg Ausgangsmaterial (Rf 0,33, TLC mit abs. Chlf.), anschliessend geringe Mengen einer Mischfraktion und zuletzt 92 mg chlorfreier Ester III (Rf 0,26) erhalten. Zur Analyse wurde das Hydrierungsprodukt bei  $80^\circ$  (0,01 Torr) destilliert. Die Verbindung war nach IR.- und NMR.-Spektrum (Fig. 5) identisch mit dem durch Permanganatabbau aus Chlorothricin erhaltenen Nebenprodukt (s. oben).

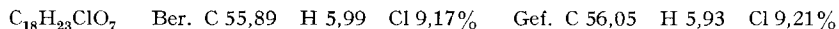
$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$	Ber. C 66,65	H 6,71%	Gef. C 66,65	H 6,81%
--	--------------	---------	--------------	---------

*Synthese von 6-Methoxy-2-methylbenzoesäure-methylester (III).* Zu 124 mg nach ELIEL [4] hergestellter 6-Methylsalicylsäure in 3 ml abs. Methanol wurden 37,5 mg Natrium gegeben und die Lösung nach beendeter Reaktion abgedampft [19]. Das im Hochvakuum getrocknete gelbliche Pulver wurde mit 2 g Methyljodid im Bombenrohr 5 Std. auf 150° erhitzt. Das überschüssige Methyljodid wurde im Vakuum abgetrieben, der Rückstand in Wasser gelöst und mit 20 ml Äther extrahiert. Der Auszug wurde an 25 g Kieselgel chromatographiert und gab mit abs. Chloroform als Eluierungsmittel zunächst 27 mg 6-Methylsalicylsäure-methylester (Rf 0,26, TLC mit abs. Chloroform) und nach einer kleinen Übergangsfraction 33 mg *Methoxy-ester III* (Rf 0,20). Für die Aufnahme der IR.- und NMR.-Spektren, die in jeder Hinsicht mit denen des Abbauesters übereinstimmen, wurde die Probe bei 80° im Hochvakuum destilliert.

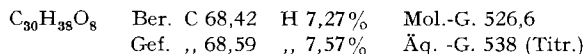
*Methanolyse von Chlorothricin.* 2,0 g Chlorothricin (dreimal umkristallisiert) wurden mit 2 g konz. Schwefelsäure in 80 ml abs. Methanol 3 Std. unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde auf Eis gegossen und dreimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschenen Auszüge wurden mit Natriumsulfat getrocknet, zu 1,62 g gelblichem Öl eingedampft und an 220 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 7:3 wurden 535 mg Methanolyseprodukt B eluiert, anschliessend wurden 153 mg Gemisch der Methanolyseprodukte B und C erhalten. Mit Chloroform-Äthylacetat 1:1 wurde darauf 620 mg reines Methanolyseprodukt C erhalten.

*Methanolyseprodukt B (IX).* Nach nochmaliger Chromatographie farblose Flüssigkeit. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) 218 nm (4,00), 281 nm (3,48), 292 nm (Schulter, 2,46). IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform:  $\nu_{max}$  3500 und 1735 cm<sup>-1</sup>. NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> s. Tabelle 3.

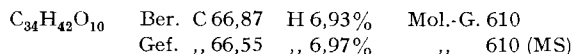
Das mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei 20° hergestellte *Acetylderivat X* wurde an Kieselgel chromatographiert und eine Spitzenfraction mehrmals aus Äther-Petroläther umkristallisiert und im Hochvakuum sublimiert: Smp. 141–143°. NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> s. Tabelle 3. Das Massenspektrum zeigt für die Molekelionen Signale bei *m/e* 386 und 388 im Verhältnis 3:1 entsprechend der Anwesenheit von einem Chloratom.



*Methanolyseprodukt C (XI).* Durch Kristallisation aus Äther und Umkristallisieren aus Aceton-Äther wurden farblose Kristalle vom Smp. 227–228 erhalten. UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit:  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) 225 nm (4,25), 257 nm (Schulter, 4,00). UV.-Absorptionsspektrum in 0,01*N* alkoholischer NaOH: 216 nm (4,22), 258 nm (4,23). IR.-Absorptionsspektrum in KBr:  $\nu_{max}$  1780, 1715, 1680, 1640 cm<sup>-1</sup>. NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub> s. Fig. 6. Mikrotitration in Methylcellosolve-Wasser 8:2:  $pK_{MCS}^*$  5,00,  $[\alpha]_D = -20,5^\circ$  ( $c = 1\%$  in Chlf.).



Das mit Essigsäureanhydrid und Pyridin hergestellte *Acetylderivat XII* gab nach chromatographischer Reinigung und Umkristallisation aus Äther farblose Kristalle vom Smp. 237–240°. IR.-Absorptionsspektrum in KBr:  $\nu_{max}$  1790, 1757, 1728 (breit), 1706, 1640 cm<sup>-1</sup>; in Chloroform keine OH-Banden. NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub>: u. a.  $\delta$  2,08 (s, 3 H), 2,27 (s, 3 H), 3,80 (s, 3 H).



*Methanolyse des Di-O-methylchlorothricins.* 1 g Di-O-methylchlorothricin wurde mit 100 ml abs. Methanol und 6 ml konz. Schwefelsäure 2 Std. auf dem Wasserbad gekocht. Nach Giessen des Gemisches auf Eis wurden durch dreimaliges Extrahieren mit Äthylacetat 0,97 g Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm die Anwesenheit von zwei Komponenten anzeigte.

Das Rohprodukt wurde mit Essigsäureanhydrid und Pyridin bei 20° über Nacht acetyliert und der Rückstand nach dem Eindampfen an 150 g Kieselgel chromatographiert. Mit Chloroform-Äthylacetat 19:1 wurden zunächst 35 mg Kristalle vom Smp. 141–143° eluiert, die nach Rf-Wert und Misch-Smp. identisch waren mit dem Acetylderivat des Methanolyseproduktes B (X, s. oben). Die nachfolgenden 376 mg Eluat waren ein Gemisch, woraus durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Äther 189 mg reines *Methanolyseprodukt-D-acetat (XIV)* erhalten wurden. NMR.-Spektrum in CDCl<sub>3</sub>:  $\delta$  2,08 (s, 3 H), 3,76 (s, 3 H), 4,04 (s, 3 H). Die übrigen Signale entsprechen im wesentlichen

denen des Methanolyseproduktes C. IR.-Absorptionsspektrum in Nujol:  $\nu_{max}$  1785, 1765, 1735, 1717, 1683  $\text{cm}^{-1}$ , keine OH-Banden.

$\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_9$	Ber. C 68,02	H 7,27%	Mol.-G. 582
	Gef. „ 68,28	„ 7,47%	„ 582 (MS)

*Alkalische Spaltung des Methanolyseproduktes B.* 562 mg Methanolyseprodukt B (durch einmalige Chromatographie gereinigt, enthält noch chlorfrei Analoges) wurden mit 15,5 ml 1N alkoholischer Natronlauge 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Die erkaltete Lösung wurde mit 50 ml Wasser verdünnt und mit je 30 ml Äthylacetat viermal ausgeschüttelt. Eindampfen der mit wenig Wasser gewaschenen und getrockneten Auszüge im Vakuum ergab 79 mg gelbliches visköses Öl, das nach Chromatographie an 8 g Kieselgel (Elution mit Äthylacetat) 55 mg chromatographisch einheitliches (Rf 0,31 mit Äthylacetat) *Methyl-2-desoxy-D-rhamnosid* gab. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit einem Präparat, das durch Abbau von Venturicidin B erhalten worden war [5], mittels IR.-Spektrum, NMR.-Spektrum und Dünnschichtchromatographie.  $[\alpha]_{578} = +150^\circ$  ( $c = 0,45\%$  in Aceton).

Durch Extraktion der wässrigen Phase mittels *n*-Butanol wurden weitere 80 mg Neutralteil gewonnen, der gemäss NMR.-Spektrum vorwiegend das Butylglykosid des gleichen Zuckers war und sich offenbar während der Extraktion durch Umacetalisierung aus dem Methylglykosid gebildet hatte.

Die wässrigen Anteile des Reaktionsproduktes wurden mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt und mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Durch Eindampfen der gewaschenen und getrockneten Auszüge wurden 285 mg Säuren erhalten. Nach der Veresterung mit Diazomethan zeigte ein Dünnschichtchromatogramm (abs. Chloroform als Fließmittel) die Anwesenheit von zwei Substanzen mit Rf 0,38 bzw. 0,28. Durch Chromatographie an 33 g Kieselgel wurden zunächst 198 mg *3-Chlor-6-methoxy-2-methyl-benzoesäure-methylester (I)* und nach einer kleinen Mischfraktion 24 mg *6-Methoxy-2-methyl-benzoesäure-methylester (III)* als farblose Öle erhalten und durch Destillation im Hochvakuum bei 80° gereinigt. Die Identifizierung mit den entsprechenden Produkten des oxydativen Abbaues erfolgte mittels IR.-, NMR.- und Massenspektren.

Die Analysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium der ETH (Leitung W. MANSER) ausgeführt. Die IR.- und NMR.-Spektren verdanken wir der Abteilung für Instrumentalanalyse der ETH (Leitung Prof. W. SIMON), die Massenspektren Herrn Dr. J. SEIBL.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 72. Mitteilung: M. BALERNA, W. KELLER-SCHIERLEIN, C. MARTIUS, H. WOLF & H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol. (im Druck).
- [2] R. HÜTTER, «Systematik der Streptomyceten», Bibliotheca Microbiol., Fasc. 6, 1967.
- [3] H. BARBIER, Helv. 11, 152 (1928).
- [4] E. L. ELIEL, D. E. RIVARD & A. W. BURGSTÄHLER, J. org. Chemistry 18, 1679 (1953).
- [5] M. BRUFANI, W. KELLER-SCHIERLEIN, W. LÖFFLER, I. MANSPERGER & H. ZÄHNER, Helv. 51, 1293 (1968).
- [6] YU. A. BERLIN, S. E. ESİPOV, M. N. KOLOSOV, M. M. SHERYAKIN & M. G. BRAZHNIKOVA, Tetrahedron Letters 1964, 1323.
- [7] M. MIYAMOTO, Y. KAWAMATSU, M. SHINOHARA, Y. NAKADAIRA & K. NAKANISHI, Tetrahedron 22, 2785 (1969).
- [8] F. BUZZETTI, F. EISENBERG, H. N. GRANT, W. KELLER-SCHIERLEIN, W. VOSER & H. ZÄHNER, Experientia 24, 320 (1968).
- [9] R. REES, C. R. GAVILANES, W. MEIER, A. FÜRST & K. MEYER, Helv. 44, 1607 (1961); P. STÜDER, S. K. PAVANARAM, C. R. GAVILANES, H. LINDE & K. MEYER, Helv. 46, 23 (1963); H. FREITAG, S. SPENGLER, H. H. A. LINDE & K. MEYER, Helv. 50, 1336 (1967).
- [10] W. ZORBACH & J. P. CLAUDELLI, J. org. Chemistry 30, 451 (1965).
- [11] M. E. BERGY & R. R. HERR, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1966, 625.
- [12] L. J. HANKA, J. S. EVANS, D. J. MASON & A. DIETZ, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1966, 619.
- [13] L. J. HANKA, M. E. BERGY & R. B. KELLY, Science 154, 1667 (1966).

- [14] A. D. ARGOUDELIS, R. R. HERR, D. J. MASON, D. R. PYKE & J. F. ZIESERL, *Biochemistry* **6**, 165 (1967).  
 [15] L. J. HANKA, *J. Bacteriol.* **80**, 30 (1960).  
 [16] L. SLECHTA, *Biochem. Pharmacol.* **5**, 96 (1960).  
 [17] G. A. FISCHER & J. J. KABARA, *Analyt. Biochemistry* **9**, 303 (1964).  
 [18] P. Onnertz, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **34**, 3735 (1902).  
 [19] C. SCHALL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **12**, 823 (1879).

### 13. Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen VI.

#### **7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -Dihydroxydigitoxigenin und Abbau von 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin zum 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -Diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ H- $\beta$ -tiansäure-methylester**

15. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von **M. Scherrer-Gervai, L. Gsell** und **Ch. Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(3. XII. 68)

*Summary.* Digitoxigenin (**3**) was transformed by a *Fusarium spec.* to 7 $\beta$ -hydroxydigitoxigenin (**1**), 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxydigitoxigenin (**4**) and to the hitherto unknown 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -dihydroxydigitoxigenin (**9**). 7 $\beta$ -acetoxy-digitoxigenin (**2**) was degraded to methyl 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diacetoxy-14-hydroxy-5 $\beta$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ H- $\beta$ -tiansäure (**11**).

Während es heute möglich ist, in nahezu alle Stellungen des Androstan- und Pregnangerüsts mit Hilfe von Mikroorganismen Hydroxylgruppen einzuführen, sind in der Cardenolidreihe analoge Hydroxylierungen erst an einer beschränkten Zahl von C-Atomen realisiert worden [2]. Bei Digitoxigenin, dem einfachsten Vertreter der digitaloiden Lactone, hat man bisher Monohydroxylierungen in den Stellungen 1 $\beta$  [3], 5 $\beta$  [3] [4], 6 $\beta$  [5], 7 $\beta$  [3] [6–10], 11 $\alpha$  [5] [11], 12 $\beta$  [9] [12–14] und 16 $\beta$  [13] sowie Dihydroxylierungen in den Stellungen 1 $\beta$ ,7 $\beta$  [3] [15] und 5 $\beta$ ,7 $\beta$  [3] [15] beobachtet.

Im folgenden berichten wir über die Umsetzung von Digitoxigenin (**3**) mit einer *Fusarium spec.* (Stamm S33). Sie wurde wie üblich aerob in Schüttelkulturen bei 25–27° vorgenommen.

Es resultierten drei Produkte, die nach chromatographischer Reinigung in einheitlichen Kristallen isoliert wurden. Das Hauptprodukt vom Doppel-Smp. 249–252°/268–275° war nach Misch-Smp. mit einer authent. Probe, IR.-Spektrum, spez. Drehung und Laufstrecke im Dünnschichtchromatogramm mit dem bekannten 7 $\beta$ -Hydroxydigitoxigenin (**1**) [5–7] identisch. Die CrO<sub>3</sub>-Oxydation ergab die 3-Dehydro- und 3,7-Bisdehydro-Derivate **7** und **12**, deren physikalische Daten ebenfalls mit den Angaben in der Literatur [7] übereinstimmten. Auch das NMR.-Spektrum von **1** zeigte alle charakteristischen Signale (s. exper. Teil). – Beim zweiten Stoff vom Smp. 256–261°, der in etwas kleinerer Menge anfiel, handelt es sich auf Grund aller oben genannten Kriterien um das bekannte 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydigitoxigenin (**4**) [3] [15]. Auch die Eigenschaften des Di-O-acetylderivats **5** stimmten mit denjenigen