

## 25. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

98. Mitteilung [1]

### Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin

von E. Bayer, K. H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow<sup>1)</sup>,  
W. A. König und H. Zähler

Lehrstuhl für Organische Chemie und Lehrbereich Mikrobiologie der Universität Tübingen,  
Deutschland

(1. X. 71)

*Summary.* From cultures of *Streptomyces viridochromogenes* a new antibiotic, phosphinothricyl-alanyl-alanine, has been isolated. The new amino acid phosphinothricin is 2-amino-4-methylphosphino-butyric acid, its structure is confirmed by synthesis.

The tripeptide is highly active against *Gram*-positive and *Gram*-negative bacteria and against the fungus *Botrytis cinerea*. Phosphinothricin is an active glutamine synthetase inhibitor.

Der Streptomycetenstamm Tü 494 der Art *Streptomyces viridochromogenes* produziert mehrere naheverwandte Antibiotica. Die Hauptkomponente ist ein Peptid und ist gegen verschiedene Bakterien gut wirksam. Es ist ausserdem eine Hemmung von Pilzen (*Botrytis cinerea*) zu beobachten. Die antibiotische Wirkung wird durch Glutamin aufgehoben.

**Isolierung und Reinigung des Antibioticums.** – Aus dem Kulturfiltrat wurde als Hauptkomponente eine Substanz mit positiver Ninhydrinreaktion auf folgende Weise isoliert: Nach Einengen, Fällern mit der zehnfachen Menge Methanol und Abtrennung aller an Aktivkohle adsorbierbaren Substanzen – das Antibioticum befindet sich im klaren Durchlauf – wurde das Antibioticum durch aufeinanderfolgende Chromatographie an Dowex 1 X –2 und Biogel P-2 in etwa 80-proz. Reinheit erhalten. Die daraus durch Chromatographie an Aminex AG 50W X-2 erhaltene Ninhydrin-positive Hauptfraktion zeigte im Plattentest maximale Aktivität und erwies sich bei kombinierter Papierchromatographie-Papiererelektrophorese («fingerprint»-Verfahren) als einheitlich.

**Untersuchung der Hydrolysate des Antibioticums.** – Nach 24stündigem Erhitzen des reinen Antibioticums in 6N HCl bei 110° ergab die Untersuchung des Hydrolysats mit einem automatischen Aminosäure-Analysator zwei Ninhydrin-positive Substanzen. Der grössere Pik wies das Elutionsvolumen von Alanin auf, während der kleinere ungefähr mit dem Elutionsvolumen von Cysteinsäure erschien.

Die Isolierung der beiden Komponenten gelang nach Hydrolyse des Rohantibioticums durch Ionenaustauscher-Chromatographie des Hydrolysats an Aminex AG 50W X-2. Die Komponente, die im Aminosäure-Analysator das Retentionsverhalten des Alanins zeigte, konnte durch Vergleich der Massenspektren und gas-chromatographischen Retentionsdaten seiner flüchtigen Trimethylsilyl- und Trifluoracetyl-

<sup>1)</sup> Austauschstipendiat der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*. Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. USSR Academy of Sciences, Pustchino/Oka, USSR.

Derivate [2] als Alanin identifiziert werden, dessen L-Konfiguration durch gas-chromatographische Trennung an einer optisch aktiven Dipeptid-Phase nachgewiesen wurde [3].

Für die Strukturaufklärung der unbekanntenen Komponente wurden verschiedene im Mikrogramm-Masstab hergestellte Derivate sowie durch energische Oxydation erhaltenen Produkte gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. Zwecks Vereinfachung der Beschreibung nehmen wir die Bezeichnung *Phosphinothricin*, die wir für die unbekanntene Komponente vorschlagen, vorweg. Die Figur 1 zeigt das Massenspektrum des Trimethylsilylderivats mit einem Molekularpik bei  $m/e$  397.

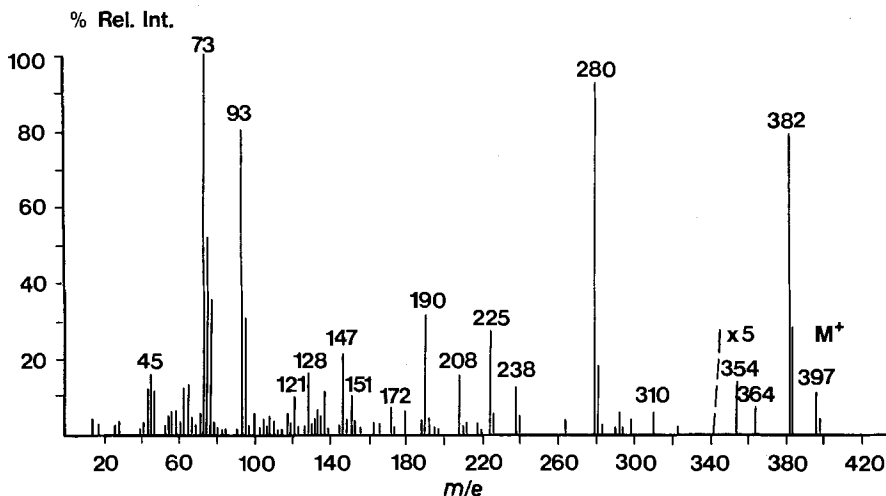


Fig. 1. Massenspektrum des Ter-trimethylsilyl-phosphinothricins  
LKB 9000, 70 eV, Direkt-Einlass

Die Anzahl der aufgenommenen Trimethylsilylgruppen und das Molekulargewicht der freien Substanz können durch Vergleich des normalen Derivates mit dem durch Verwendung von perdeutertem Bis-trimethylsilyl-acetamid<sup>2)</sup> erhaltenen Derivat festgestellt werden [4] (Fig. 2). Die Verschiebung des Molekularpiks im Massenspektrum um 27 Masseneinheiten von 397 nach 424 beweist die Aufnahme von 3 Trimethylsilylgruppen und damit die Gegenwart von mindestens 3 funktionellen Gruppen im Phosphinothricin. Diese funktionellen Gruppen können Carboxyl-, Amino-, Imino- oder Hydroxy-Gruppen sein. Das Molekulargewicht der freien Substanz ergibt sich nach Abzug von 3 Trimethylsilylgruppen zu 181. Mit diesem Wert stimmen die durch drei osmometrische Molekulargewichtsbestimmungen erhaltenen Werte von 177, 188 und 198 sehr gut überein.

Eine weitere Differenzierung der funktionellen Gruppen durch Bestimmung der Anzahl der Carboxylgruppen liess sich durch Behandlung des Phosphinothricins mit 1,25N HCl/CH<sub>3</sub>OH [5] erzielen. Bei dieser Behandlung werden normalerweise nur Carboxylgruppen methyliert. Das Reaktionsprodukt wurde mit Bis-(trimethylsilyl)-

<sup>2)</sup> Wir danken Dr. J. A. McCloskey, Baylor College of Medicine, Houston/Texas, für die Überlassung von perdeutertem BSA.

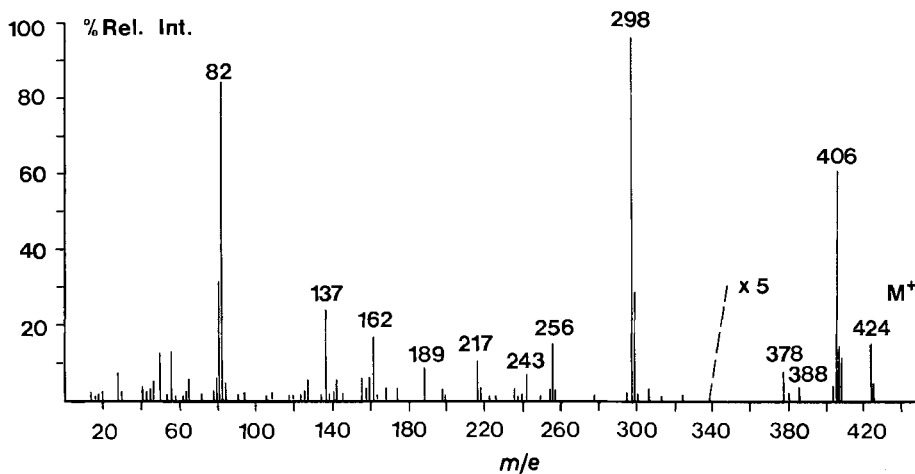


Fig. 2. Massenspektrum des *Ter-perdeuteriotrimethylsilyl-phosphinothricins*  
LKB 9000, 70 eV, Direkt-Einlass

trifluoracetamid silyliert. Das Massenspektrum dieses Derivates zeigt die Aufnahme einer einzigen Methylgruppe anstelle einer Trimethylsilylgruppe des durch direkte Silylierung erhaltenen *Ter-trimethylsilyl-phosphinothricins*: Es ist also nur eine Carboxylgruppe im Phosphinothricin vorhanden.

Durch Methylierung mit Diazomethan und anschließende Trifluoracetylierung mit Trifluoracetanhydrid erhielt man ein wichtiges Derivat. Sein Massenspektrum (Fig. 3) zeigte einen Molekularpik bei  $m/e$  305, d. h. die Aufnahme von 2 Methylengruppen und einer Trifluoracetylgruppe, bei einem Molekulargewicht des Ausgangsproduktes von 181. Die Abspaltung eines  $\text{CH}_3$ -Radikals führt zu  $m/e$  290. Weiterhin ist der Verlust von  $\text{OCH}_3$  ( $m/e$  274) und  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $m/e$  273) und die Abspaltung eines

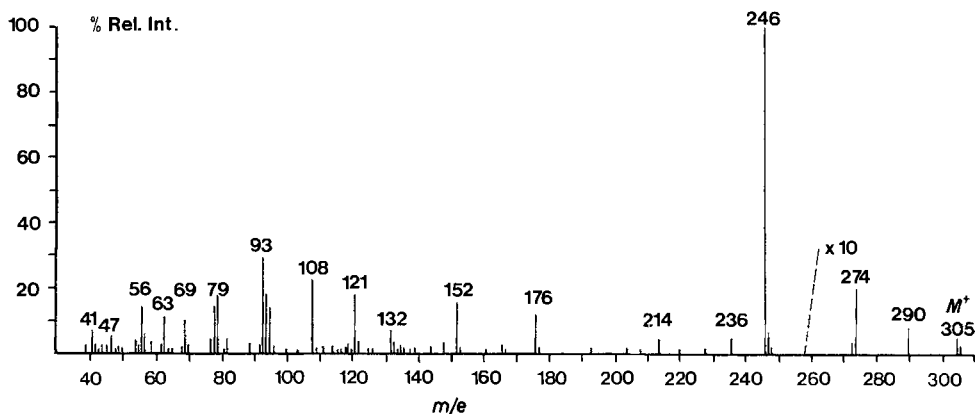


Fig. 3. Massenspektrum des aus *Phosphinothricin* durch Behandlung mit *Trifluoressigsäureanhydrid* und *Diazomethan* erhaltenen Produktes  
LKB 9000, 70 eV, GC.-MS.

COOCH<sub>3</sub>-Restes (*m/e* 246) zu erkennen. Von *m/e* 246 führt Eliminierung von H<sub>2</sub>O zu *m/e* 228 und von CH<sub>3</sub>OH zu *m/e* 214. Eine weitere Fragmentierungsreaktion von *m/e* 246 nach *m/e* 132 deutet auf die Abspaltung von Trifluoressigsäure hin. Alle diese Fragmentierungen sind durch metastabile Übergänge belegt. Nach Abzug einer Carboxylgruppe bleibt noch eine weitere saure Funktion im Phosphinothricin, die mit Diazomethan, nicht aber mit HCl/CH<sub>3</sub>OH, reagiert.

Den Nachweis einer CH<sub>3</sub>-P-Gruppe erbrachte die Untersuchung der Oxydationsprodukte des Phosphinothricins. Je 100 µg Substanz wurden mit konz. HNO<sub>3</sub> abgeraucht bzw. mit Peroxyameisensäure behandelt. Die Reaktionsprodukte wurden trimethylsilyliert und gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. Fig. 4 und 5 zeigen die Massenspektren der Trimethylsilylderivate von zwei Reaktions-

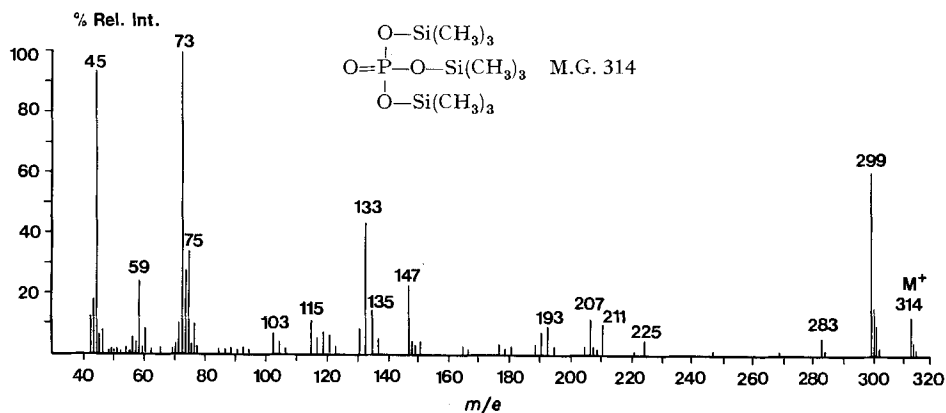


Fig. 4. Massenspektrum des durch HNO<sub>3</sub>-Behandlung von Phosphinothricin erhaltenen Produktes nach Trimethylsilylierung  
LKB 9000, 70 eV, GC.-MS.

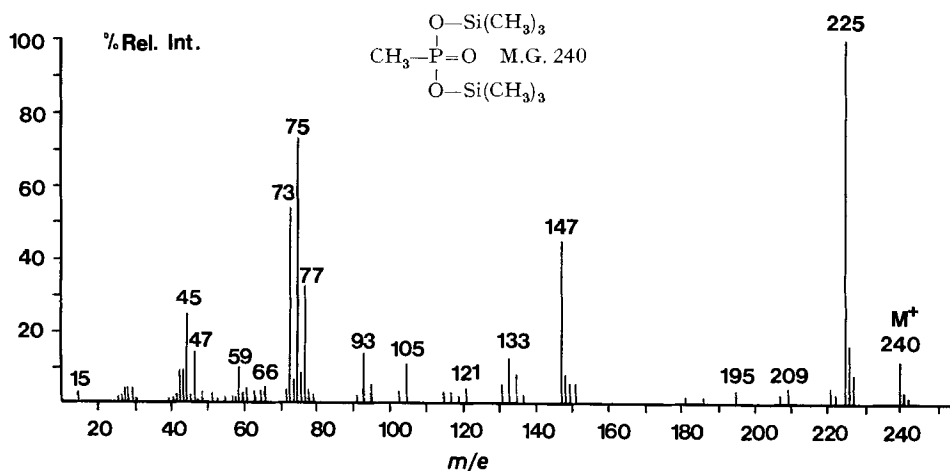


Fig. 5. Massenspektrum des durch HCOOH-Behandlung von Phosphinothricin erhaltenen Produktes nach Trimethylsilylierung  
LKB 9000, 70 eV, GC.-MS.

produkten, die als die Derivate der Phosphorsäure bzw. der Methanphosphonsäure identifiziert werden konnten. Die Massenspektren beider Derivate stimmen mit den unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Spektren von Vergleichssubstanzen genau überein [6]. Die Phosphorsäure liess sich auch in einer Mikrofarbreaktion mit Ammoniummolybdat [7] nachweisen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, vor allem der Massenspektren, konnte angenommen werden, dass es sich bei der unbekanntenen Aminosäure um 2-Amino-4-methylphosphino-buttersäure (VI) handelt, was die vorgeschlagene Bezeichnung



Phosphinothricin erklärt. Mit dieser Struktur stimmt auch die durch Hochauflösungsmassenspektrometrie<sup>3)</sup> erhaltene exakte Massenbestimmung verschiedener Fragmente des Trimethylsilylderivates und des Trifluoracetylderivates der isolierten Verbindung (Tab. 1) sehr gut überein.

Tabelle 1. *Exakte Massenbestimmung mittels Hochauflösungsmassenspektrometrie*

<i>m/e</i>	Elementar- zusammensetzung	berechnet	gefunden	Abweichung in Millimassen- einheiten
246	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> P	246,0507	246,0500	+ 0,7
214	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> P	214,0245	214,0241	+ 0,4
152	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> NO	152,0323	152,0330	- 0,7
108	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> P	108,0340	108,0332	+ 0,8

Das <sup>1</sup>H-NMR.-Spektrum<sup>4)</sup> (Fig. 6), entspricht in allen Einzelheiten der vorgeschlagenen Struktur. Besonders auffällig ist die Aufspaltung der CH<sub>3</sub>-Gruppe bei δ = 1,28 und δ = 1,42 mit einer Kopplungskonstanten von 14 Hz, was sich durch Spin-Spin-Kopplung der CH<sub>3</sub>-Protonen mit dem <sup>31</sup>P-Kern erklären lässt. Hierbei sind Kopplungskonstanten dieser Grössenordnung zu erwarten [8]. Dass es sich tatsächlich um ein Dublett handelt, zeigte ein Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR.-Spektren bei 100 MHz und 60 MHz. Die Aufspaltung beträgt in beiden Fällen 14 Hz.

Das komplizierte Multiplett zwischen δ = 1,5 und δ = 2,3 rührt von den Protonen an C<sub>β</sub> und C<sub>γ</sub> her, die sowohl untereinander als auch mit dem nachbarständigen <sup>31</sup>P-Kern und dem C<sub>α</sub>-Proton koppeln. Das C<sub>α</sub>-Proton koppelt mit den beiden C<sub>β</sub>-Protonen und erscheint als Triplet mit einem Maximum bei δ = 3,95.

Die Konfigurationsbestimmung am α-C-Atom des natürlichen Phosphinothricins steht noch aus.

<sup>3)</sup> Wir danken Herrn Dipl.-Chemiker *A. Huth*, Chemisches Institut Tübingen, für die Hochauflösungsmessungen.

<sup>4)</sup> Für die Aufnahme des 100-MHz-Spektrums danken wir Herrn Dr. *Sonnenbichler*, Max-Planck-Institut für Biochemie, München. Herrn Dr. *E. Breitmaier* sowie Herrn Dr. *P. Hunziker*, Chemisches Institut Tübingen, sind wir für die Aufnahme und Diskussion von NMR.-Spektren zu Dank verpflichtet.

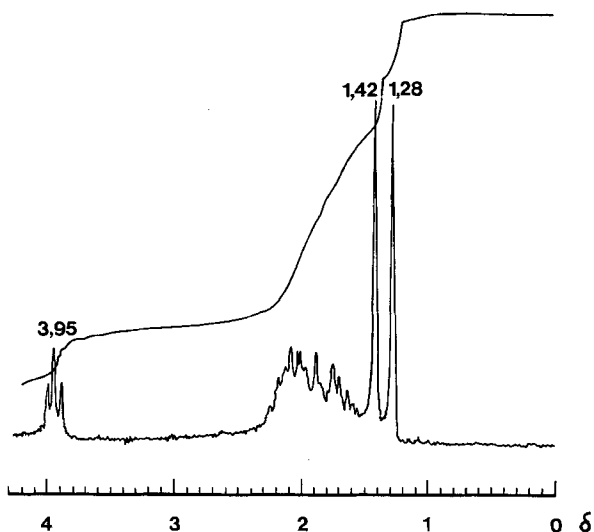
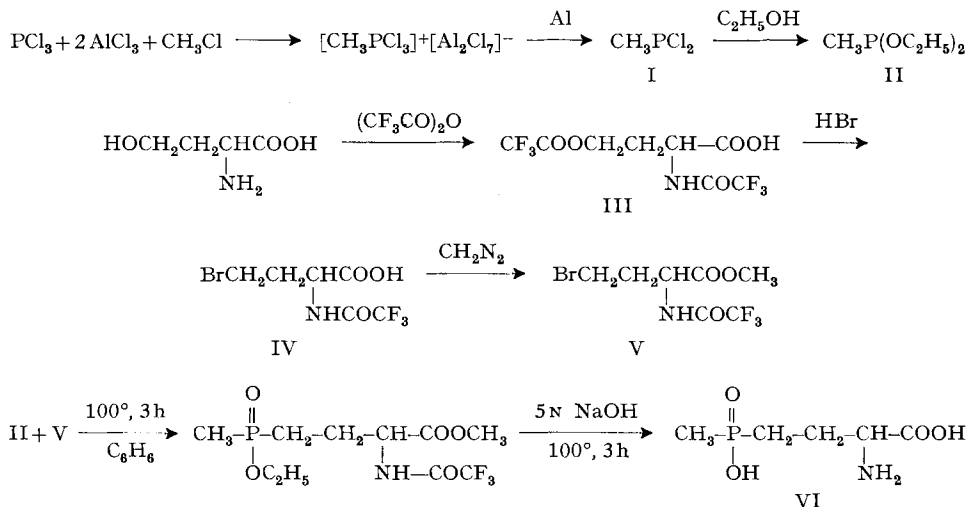


Fig. 6.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Phosphinothricin  
100 MHz, Varian HA 100, Lösungsmittel:  $\text{D}_2\text{O}$

**Synthese von DL-Phosphinothricin.** Die Synthese der 2-Amino-4-methylphosphino-buttersäure, die sich als DL-Phosphinothricin erwies, wurde nach folgendem Schema durchgeführt:



Zunächst wurde nach [9] Methyl-dichlor-phosphin (I) hergestellt. Letzteres wurde mit Äthanol zu Methanphosphonigsäure-diäthylester (II) umgesetzt (erste Komponente). Der als zweite Komponente benötigte 2-Trifluoracetyl-amino-4-brom-buttersäure-methylester (V) wurde auf folgende Weise erhalten: DL-Homoserin wurde mit Trifluoracetanhydrid diacyliert. Im acylierten Derivat III wurde in Trifluoressig-

säure-Lösung durch Einleiten von HBr-Gas die Trifluoracetoxygruppe durch Brom ersetzt (IV); zuletzt wurde durch Veresterung der Carboxylgruppe von IV mit Diazomethan V erhalten. Die beiden Komponenten II und V wurden in Benzol-Lösung in einer Art *Michaelis-Arbusov*-Reaktion [10] kondensiert. Dieser Syntheseweg hat den Vorteil, dass alle Zwischenprodukte und das Endprodukt durch kombinierte Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie kontrolliert werden können. Fig. 7 zeigt das

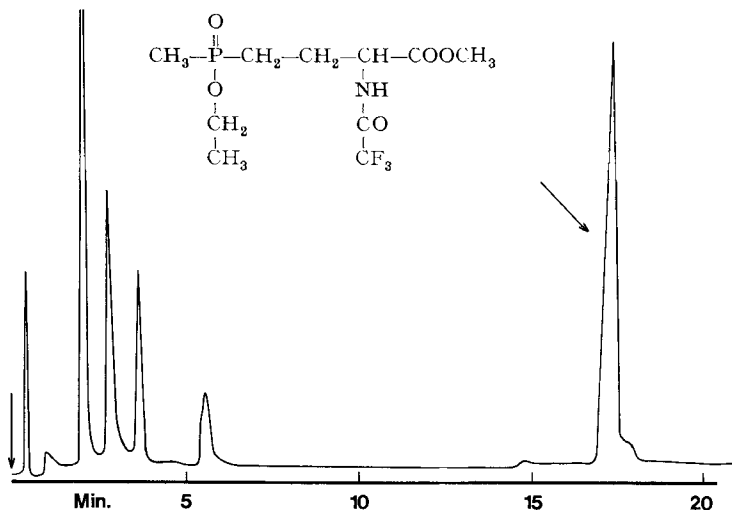


Fig. 7. Gas-Chromatogramm von synthetischem *rac.* Phosphinothricin

LKB 9000, GC.-MS.; 3-m-Glassäule, 4% OV 17 auf Chromosorb WAW; 120–200°, Temp.-Programm: 8°/Min.; Trägergas: 25 ml He/Min.; Einspritzblock: 200°; Separator 220°; Ionenquelle 250°

Gas-Chromatogramm der benzolischen Lösung nach dem letzten Syntheseschritt. Die Schutzgruppen des Syntheseprodukts wurden in *einem* Schritt durch Erhitzen mit wässriger 5 N NaOH abgespalten. Die so erhaltene 2-Amino-4-methylphosphinobuttersäure (VI) wurde durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt: Sie stimmt in ihren nicht-chiralen Eigenschaften (Massenspektren verschiedener Derivate, Aminosäure-Analyse) mit dem Naturprodukt überein (vgl. Fig. 8 mit Fig. 3). Sie zeigt bei doppelter Konzentration auch gleiche biologische Aktivität im Plattendiffusionstest und gegen Glutaminsynthetase, wie dies bei Einsatz der *DL*-Form zu erwarten ist.

**Struktur des Antibioticums.** – Die Aminosäure-Analysen sowie die GC.-MS.-Untersuchungen deuten darauf hin, dass im Hydrolysat des Antibioticums Phosphinothricin und L-Alanin im Verhältnis 1:2 vorliegen (Fig. 9). Analog zu den Experimenten mit Phosphinothricin wurde versucht, für Massenspektrometrie geeignete flüchtige Derivate des Antibioticums herzustellen. Es wurde die übliche Methode der Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid und nachfolgender Veresterung mit  $\text{CH}_2\text{N}_2$  angewandt. Die Untersuchung des Derivates im Massenspektrometer zeigte überraschenderweise das Vorhandensein eines Derivates von Phosphinothricinyl-Alanin mit N-terminalem Phosphinothricin an (s. unten).

Darauf wurde reines Antibioticum nach *Edman* abgebaut. Wie die massenspektrometrische Untersuchung des dabei erhaltenen Phenylthiohydantoin-Derivates zeigte,

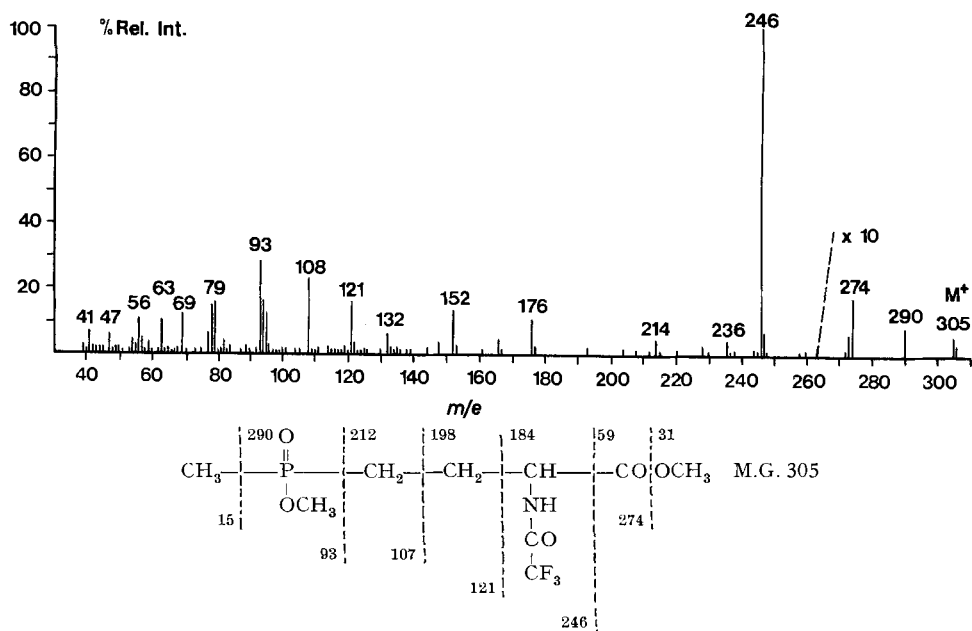


Fig. 8. Massenspektrum des aus synthetischer 2-Amino-4-methylphosphino-buttersäure durch Behandlung mit Trifluoressigsäureanhydrid und Diazomethan erhaltenen Produktes

LKB 9000, 70 eV, GC.-MS.

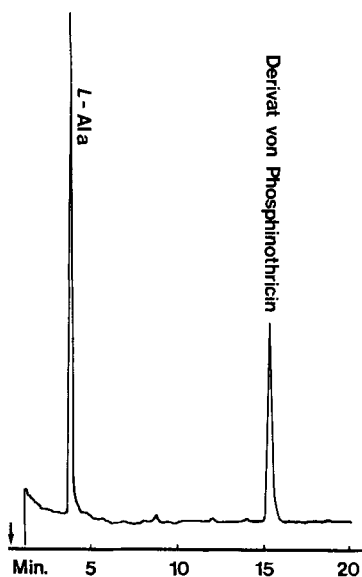


Fig. 9. Gas-Chromatogramm des Antibioticum-Hydrolysats nach Behandlung mit Trifluoressigsäureanhydrid und Diazomethan

LKB9000, GC.-MS.; 3-m-Glassäule, 3% OV17 auf Chromosorb WAW; 80–200°, Temp.-Programm: 8°/Min.; weitere Bedingungen wie in Fig. 7



liegt Phosphinothricin als N-terminale Aminosäure vor. Dies war nach den zuvor beschriebenen Untersuchungen zu erwarten. Der Rückstand des *Edman*-Abbaus wurde mittels Papierelektrophorese untersucht. Beim Vergleich mit L-Alanin und L-Ala-L-Ala verhielt er sich eindeutig wie L-Ala-L-Ala und nicht wie L-Alanin. Dieses Verhalten wies klar auf eine Sequenz Phosphinothricin-L-Ala-L-Ala hin, deren Vorliegen durch gas-chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen weiterhin bestätigt wurde. Das Antibioticum wurde zunächst in konz. HCl bei 37° partialhydrolysiert [11]. Nach 24 h und 72 h wurden Proben entnommen. Nach Abziehen der Salzsäure wurden daraus durch Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid und Diazomethan die N-Trifluoracetyl-O-Methyl-Derivate der Hydrolysenprodukte hergestellt. Durch GC.-MS.-Untersuchungen wurden folgende Derivate der Hydrolysenprodukte nachgewiesen: 1. TFA-Ala-OMe; 2. TFA-Ala-Ala-OMe; 3. TFA-Phosphinothricin-OMe; 4. TFA-Phosphinothricinyl-Ala-OMe. Die Mengenverhältnisse sind im wesentlichen unabhängig von der Dauer der Hydrolyse.

Damit wurden im Partialhydrolysat alle möglichen Bruchstücke des Tripeptids gefunden. Zur Verhinderung der Spaltung der Peptidbindung zwischen den beiden Alanin-Resten bei der Behandlung mit Trifluoressigsäureanhydrid wurde die Amino-Gruppe des Antibioticums bei pH 7,5 mit Trifluoressigsäure-methylester acyliert und

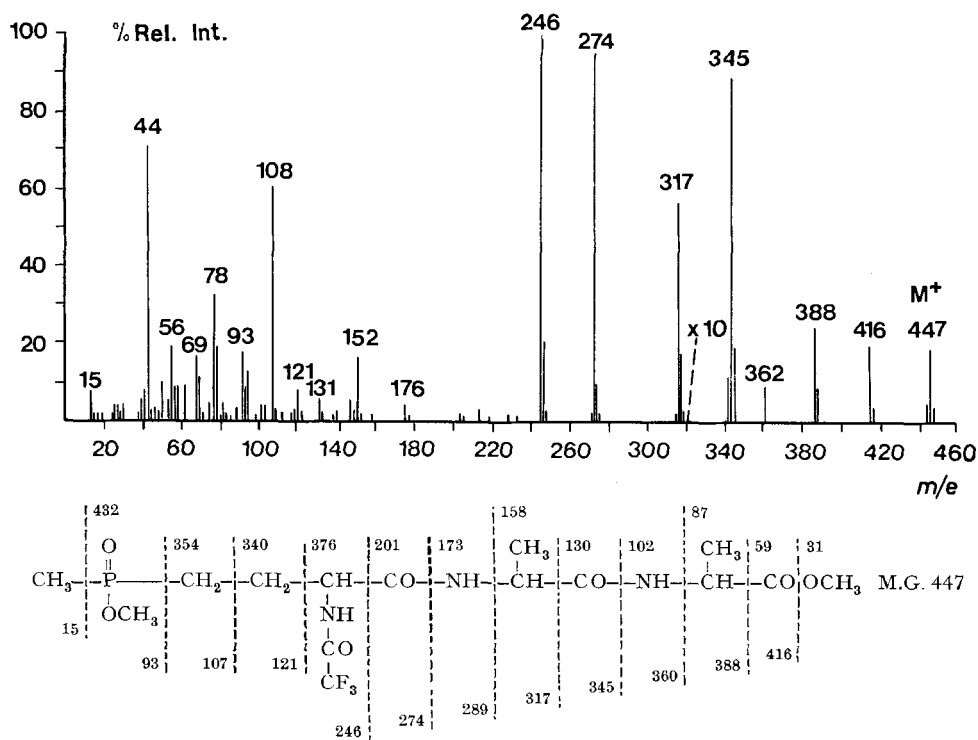


Fig. 10. Massenspektrum und Fragmentierungsschema des Antibioticums nach Behandlung mit Trifluoressigsäure-methylester und Diazomethan

LKB 9000, 70 eV, Direkt-Einlass

die Carboxylgruppe mit  $\text{CH}_2\text{N}_2$  verestert [10]. Das Massenspektrum (Fig. 10) beweist die Tripeptidstruktur und die Sequenz Phosphinothricin-Ala-Ala. Die für die Identifizierung wichtigsten Ionen sind der Molekularpik bei  $m/e$  447 und die Ionen bei  $m/e$  246, 274, 317, 345, 388, 416, die durch die charakteristische Fragmentierung beiderseits der CO-Gruppe der Peptidbindungen entstehen [12]. Das Spektrum ist im unteren Massenbereich vorwiegend durch die Fragmente des N-terminalen Phosphinothricins bestimmt (vgl. Fig. 3).

**Biologische Aktivität von Phosphinothricin und von Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin** (Tab. 2, Fig. 11 und 12). – Antibiotica, die Phosphor enthalten, sind selten. Von Streptomyceten-Antibiotica sind nur das Phosphonomycin [13] und die Moenomycin-Prasinomycin-Diumycin-Macarbomycin-Gruppe [14] bekannt. Beides sind Hemmstoffe der Zellwandsynthese, sie sind weder im chemischen Aufbau noch in der Wirkungsweise mit dem Phosphinothricyl-alanyl-alanin verwandt.

Das Tripeptid zeigt gegen *Gram*-positive und *Gram*-negative Bakterien und den Pilz *Botrytis cinerea* eine sehr gute antibiotische Wirkung. Phosphinothricin selbst wirkt im Vergleich zum Tripeptid nur sehr schwach. Die untere Nachweisgrenze im Plattendiffusionstest liegt für das Tripeptid mit *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* bei 0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , für das Phosphinothricin bei 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , d. h. 10000fach höher.

Tabelle 2. *Wirksamkeit von Phosphinothricin und dem Tripeptid im Plattendiffusionstest*  
(Zahlen: Hemmhofdurchmesser in mm, Durchmesser der Filterrondellen 6 mm)

	Tripeptid 1 mg/ml	Phosphinothricin 1 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> K12	44 mm	–
<i>Bacillus subtilis</i>	46 mm	20 mm
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	36 mm	11 mm
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	44 mm	–
<i>Botrytis cinerea</i>	34 mm	–

Mit Hilfe des Kreuztests konnte L-(+)-Glutamin als einzige die Wirkung des Tripeptids gut aufhebende Aminosäure gefunden werden. Der Kreuztest liefert das Bild einer kompetitiven Aufhebung mit einem Inhibitionsindex von ca.  $10^4$ . Die Beeinflussung der antibiotischen Wirkung des Tripeptids (0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durch Glutamin in Flüssigkeitskultur (Biophotometer) ist aus Fig. 11 ersichtlich. Das Aufhebungsbild mit *Escherichia coli* ist dem mit *Bacillus subtilis* sehr ähnlich. Für eine vollständige Aufhebung werden allerdings bei ersterem geringere Glutaminkonzentrationen benötigt, und die maximale Wachstumsgeschwindigkeit ist nicht mehr zu erreichen.

Kultiviert man *Bacillus subtilis* auf Glutamat als einziger C-Quelle, so ist auch bei 250facher Konzentration an Phosphinothricyl-Ala-Ala keine Hemmwirkung festzustellen. Die Aufhebung der Hemmwirkung durch Glutamin und die Unwirksamkeit des Antibioticums im Glutamatmedium liessen eine Hemmung der Glutaminsynthetase vermuten. Versuche an Glutaminsynthetase<sup>5)</sup> aus *Escherichia coli* mit Phosphino-

<sup>5)</sup> Für die Überlassung von Glutaminsynthetase aus *Escherichia coli* sei dem Biochemischen Institut in Freiburg i. Br., Abteilung Prof. Holzer, sehr herzlich gedankt.

thricin und Tripeptid ergaben folgendes Bild: Das Tripeptid zeigt sogar bei einer Konzentration von  $400 \mu\text{g/ml}$  keine Wirkung auf die Glutaminsynthetase, während Phosphinothricin in geringen Dosierungen das Enzym kompetitiv zu Glutamat als variierendem Substrat hemmt (Fig. 12).

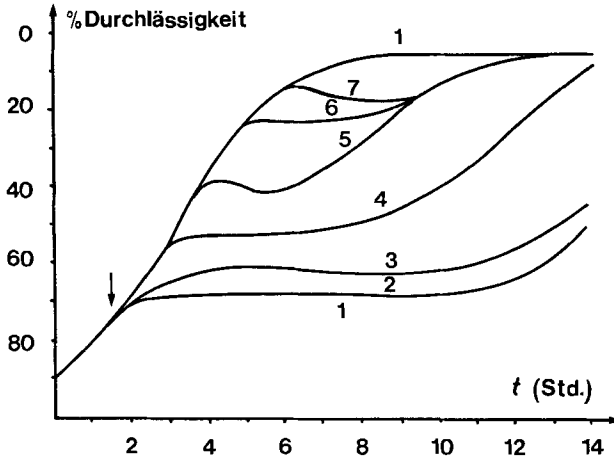


Fig. 11. Wirkung von Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin ( $0,05 \mu\text{g/ml}$ ) auf *Bacillus subtilis* bei Zugabe von Glutamin

Kurve 1: Kontrollkurve; Kurve 2–7: je  $0,05 \mu\text{g/ml}$  Antibioticum; Kurve 3–7: zusätzlich 10, 20, 40, 80 bzw.  $120 \mu\text{g/ml}$  Glutamin

Die Zugabe von Antibioticum und Glutamin ist durch den Pfeil gekennzeichnet

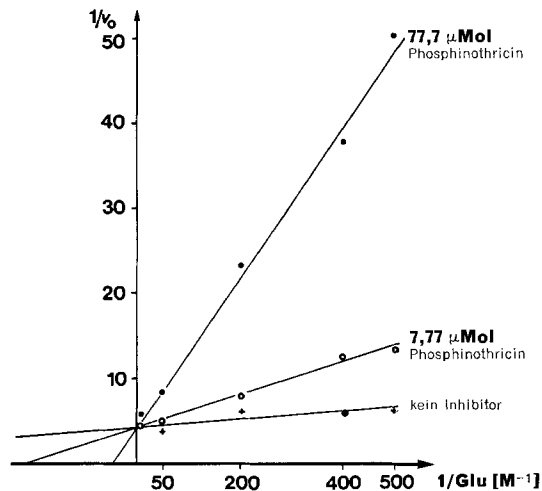


Fig. 12. Wirkung von Phosphinothricin auf Glutaminsynthetase bei variierenden Glutamatmengen als Substrat

$$(V_0 = \mu\text{Mol NAD}^+/\text{Ansatz}/10 \text{ min})$$

Die Ergebnisse aus den «*in vivo*»-Versuchen und der Vergleich der Wirkungsweise von Phosphinothricin und Tripeptid «*in vitro*» lassen für den Hemmechanismus einen Schluss zu: Die Aufnahme des Antibioticums in die Zelle wird durch die Tripeptidform stark begünstigt; zur Ausprägung der Wirksamkeit muss jedoch Phosphinothricin freigesetzt werden, da, wie die Enzymversuche zeigen, nur dieses die Glutaminsynthetase hemmt. Das spaltende Enzym wurde aus den Mikroorganismen bisher noch nicht isoliert.

Ein umgekehrter Fall war bei Ketomycin zu beobachten [15]. Hier musste eine Aminierung der biologisch inaktiven Cyclohexenyl-glyoxylsäure zur entsprechenden Aminoverbindung, die dann die Threonindesaminase hemmte, vorausgehen. Im letzten Fall liegt also eine Letalsynthese, beim Phosphinothricyl-Ala-Ala eine Letalspaltung der an sich biologisch inaktiven Vorstufen in den entsprechenden Testorganismen, vor.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

*Beschreibung des Stammes*: Der Phosphinothricin und das Tripeptid synthetisierende Actinomycetenstamm, Tü 494, wurde aus einer Bodenprobe aus Kamerun isoliert. Er ist der Gattung *Streptomyces* zuzuordnen und durch folgende artbestimmenden Merkmale gekennzeichnet:

1. Die Sporen sind ellipsoid und haben eine stachelige Oberfläche (Elektronenmikroskopie).
2. Das anfangs weissgraue Luftmycel ist in ausgereiftem Zustand graublau (*azureus-glaucus*).
3. Die Sporenketten sind in regelmässigen Spiralen angeordnet; die Verzweigung ist monopodial.
4. Auf Eisenpeptonagar bildet der Stamm ein melaninartiges Pigment.
5. Das Substratmycel ist weissgelb.

Damit stimmt der Stamm in allen artbestimmenden Merkmalen mit der Beschreibung von *Streptomyces viridochromogenes* (Krainsky) Waksman et Henrici (1948) überein (Hütter) [16].

*Fermentierung und Isolierung des Antibioticums*: Der Stamm Tü 494 wurde über 5–6 Tage bei 21 Luft/Min., 220 rpm und 27° in einem 10-l-Fermenter (*New Brunswick*) mit 101 Nährlösung inkubiert. Die Nährlösung bestand aus 6% Glycerin und 2% vollfettem Sojamehl, die mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde.

Als Impfmateriale dienten 100 ml einer 20 Tage alten, gut sporulierten Oberflächenkultur dieses Stammes. Um die Sporenauskeimung zu ermöglichen, erfolgte die Inkubation in den ersten 24 h bei 150 rpm und 0,5 l Luft/Min.; unter diesen Bedingungen konnte die Antischaumzugabe vermieden werden. Nach Erreichen der maximalen Antibioticumskonzentration in der Fermentationsbrühe (150 bis 250 µg/ml) wurde unter Zusatz von 2% Celit (Hyflo Supercel) geerntet. Das Mycel enthielt keine nennenswerten Mengen Antibioticum.

Nach Einengung des Kulturfiltrats auf ca.  $\frac{1}{10}$  wurde alles Methanolunlösliche durch Zugabe von 10 Vol. Methanol (bezogen auf das Konzentrat) ausgefällt. Das Filtrat wurde vom Methanol im Rotationsverdampfer wieder vollständig befreit und dann mit entionisiertem Wasser auf 10 l aufgefüllt. Diese Lösung wurde nach Zusatz von 3% Aktivkohle (reinst) filtriert. Das Filtrat, das die gesamte Antibioticumsmenge enthielt, wurde auf ca. 250 ml eingengt und auf eine mit Dowex 1x2, 200–400 mesh (Acetatform) beschickte Säule (130 × 3,5 cm) gegeben. Das Harz wurde mit 5 l entionisiertem Wasser gewaschen und mit den gleichen Mengen an 0,1 und 0,2 N Essigsäure voreluert. Die Elution des Antibioticums erfolgte mit 0,5 N Essigsäure bei einer Fraktionsgrösse von 50 ml.

Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt, die Essigsäure im Rotationsverdampfer entfernt und der zähflüssige Rückstand zu 5 ml in entionisiertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde über eine Biogel-P-2-Säule (50–100 mesh; Ausschlussvolumen: 2600) gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre biologische Aktivität geprüft, nach Massgabe der errechneten Antibioticumsmenge vereinigt und lyophilisiert. Nach diesem Schritt lag ein weisses Pulver vor, das die gesuchte

Substanz zu 80% enthält. Die Ausbeute bis zu dieser Reinheitsstufe (Rohantibioticum) betrug 31%.

Eine Glassäule (45 × 1,5 cm) mit Aminex AG 50 W-X 2, 200–325 mesh (*Bio-Rad Laboratories*) wurde mit dem zehnfachen Säulenvolumen 0,1N Pyridin-Ameisensäurepuffer (pH 2,75) äquilibriert. (500 ml Eluat hinterliess nach Abziehen des Lösungsmittels nur Spuren von Rückstand.) Auf die Säule wurden 160 mg Rohantibioticum, gelöst in ca. 1 ml Ameisensäure, aufgetragen und mit 0,1N Pyridin-Ameisensäurepuffer (pH 2,75) eluiert. Mit Hilfe einer Strömungsteilerpumpe wurden 10% des Eluats an einem *Beckman*-Unichrom-Aminosäureanalysator mit Ninhydrin analysiert. Es wurden Fraktionen von je 4 ml aufgefangen. Die Hauptmenge der Ninhydrin-positiven Substanz befand sich in den Fraktionen 41–56. Diese Fraktionen zeigten im Plattendiffusionstest antibiotische Wirkung. Die Ausbeute nach der Gefriertrocknung der vereinigten Fraktionen 41–56 betrug 115 mg weisse Flocken. Auf biologische Aktivität wurde an *Bacillus subtilis* auf chemisch definiertem Medium geprüft.

*Aminosäureanalysen des Antibioticums*: 2 mg reines Antibioticum wurden in 2 ml 6N HCl 10–80 Std. bei 100° hydrolysiert. Nach Abziehen der Salzsäure im Vakuum wurde das Hydrolysat mit einem automatischen Aminosäureanalysator, Modell Unichrom, der Firma *Beckman*, untersucht.

*Isolierung von Phosphinothricin*: 180 mg Rohantibioticum wurden in 220 ml 6N 24 Std. bei 110° hydrolysiert. Nach Abziehen der Salzsäure im Vakuum wurde der Rückstand in ca. 2 ml 0,2N Essigsäure gelöst und auf eine Säule mit Aminex AG 50 W-X 2 (45 × 1,5 cm) aufgetragen, die mit 0,2N Pyridin-Essigsäure-Puffer, pH 6,4, dann mit 4-proz. Essigsäure äquilibriert worden war. Bei der Elution mit 250 ml 4-proz. Essigsäure (Fraktionen zu 6 ml) erschien das Phosphinothricin in der 16. bis 30. Fraktion. Nach Elution mit 250 ml 4-proz. Essigsäure wurde die Elution mit einer Mischung aus 235 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml Essigsäure und 5 ml Pyridin (gleiche Fraktionsgrösse) fortgesetzt. In den Fraktionen 49 bis 54 wurde L-Alanin eluiert.

*Partialhydrolyse des Antibioticums*: 2 mg gereinigtes Antibioticum wurden in 1 ml konz. HCl bei 37° 72 Std. hydrolysiert. Nach Abziehen der Salzsäure wurde der Rückstand trifluoracetyliert und mit Diazomethan verestert.

*Osmometrische Bestimmung des Molekulargewichts von Phosphinothricin*: Ausgeführt mit einem *Hewlett Packard* 302 B Vapor Pressure Osmometer, bei 38° in Methanol (Eichsubstanz: Benzophenon).

C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>P Ber. M.-G. 181 Gef. M.-G. 188, 198, 177 (Durchschnitt 187)

*Derivate von Phosphinothricin*: – a) *Trimethylsilyl-Derivat*: 100 µg Phosphinothricin wurden in 100 µl Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA, Fa. *Regis*) 2 Std. bei 100° im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde die Lösung gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. – b) *Perdeuterio-trimethylsilyl-Derivat*: Analog zu a) in 100 µl Perdeuterio-bis-(trimethylsilyl)-acetamid hergestellt. – c) *Veresterung und Trimethylsilylierung*: Eine Lösung von 100 µg Phosphinothricin in 300 µl HCl/Methanol (1,25N) wurde 1 Std. im Trockenschrank bei 100° erhitzt. Danach wurde das Reagens mit trockenem Stickstoff abgeblasen und der Rückstand nach Zugabe von 100 µl BSTFA (Fa. *Regis*) 2 Std. bei 100° erhitzt. Die Lösung wurde direkt für die GC.-MS.-Untersuchungen verwendet. – d) *Trifluoracetylierung und Methylierung*: 100 µg Phosphinothricin wurden in 150 µl Methylenchlorid und 50 µl Trifluoressigsäureanhydrid aufgenommen. Nach 1 Std. Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in 100 µl Methanol gelöst. Die Lösung wurde mit einem Überschuss an frisch destillierter ätherischer Diazomethanlösung versetzt und dann sofort im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde für die GC.-MS.-Untersuchungen in 100 µl Chloroform aufgenommen.

*Oxydativer Abbau von Phosphinothricin*: – a) 100 µg Substanz wurden in rauchender HNO<sub>3</sub> in einem Mikoreagensglas abgeraucht. Der Rückstand wurde in 100 µl BSTFA aufgenommen und 2 Std. bei 100° im Trockenschrank erhitzt. Die Lösung wurde daraufhin gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht. – b) 100 µg Substanz wurden in 1 ml Peroxyameisensäure 4 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Eindampfen wurde der Rückstand in 100 µl BSTFA gelöst und bei 100° 2 Std. erhitzt. Diese Lösung diente für die GC.-MS.-Untersuchungen.

*Trifluoracetylierung und Methylierung des Antibioticums*: Eine Lösung von ca. 200 µg Antibioticum in 1 ml Methanol und 500 µl Trifluoressigsäure-methylester wurde durch Zugabe von ca. 10 µl Triäthylamin auf pH 7,5 gebracht. Nach 20 Std. Stehen bei Raumtemperatur wurde das Reagens

im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 200  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Es wurde ein Überschuss an ätherischer Diazomethanol-Lösung zugegeben und gleich darauf im Stickstoffstrom getrocknet. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Chloroform wurde das Produkt im Direkteinlass-System des Massenspektrometers untersucht. Alle Mikroreaktionen wurden in Schraubdeckelgläschen (1,5 ml Vol.) mit Teflonscheibe durchgeführt.

*Gas-chromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen:* Die Massenspektren wurden bei 70 und 11,5 eV an einem LKB-9000-Kombinationsgerät aufgenommen. Für die GC.-MS.-Untersuchungen diente eine 3 m lange Glassäule mit einem Innendurchmesser von 3 mm. Die Säule war mit Chromosorb WAW gepackt, das mit 3% OV 17 belegt war. Die Substanzen wurden in Chloroform-Lösung direkt auf die Säule aufgespritzt. Einspritzblock-Temperatur: 200°, Separator-Temperatur: 220°, Ionenquellen-Temperatur: 250°, Beschleunigungs-Spannung: 3,5 kV.

*Hochauflösungs-Massenspektrometrie:* Ausgeführt im Peakmatching-Verfahren (Vergleichssubstanz: Heptacosäfluorbutylamin) an einem MS-9-Gerät (AEI) mit Direkteinlass; Ionenquellen-Temperatur zwischen 150 und 200°, 70 eV.

*Konfigurationsbestimmung von Alanin:* Die beiden Enantiomere des Alanins wurden entsprechend [3] getrennt, und zwar an einer 150 m langen Stahl-Kapillare mit 0,75 mm Innendurchmesser, die mit TFA-L-Phe-L-Leu-Cyclohexylester belegt war. Das nach Hydrolyse durch Ionenaustauscher-Chromatographie erhaltene Alanin wurde mit HCl/Isopropylalkohol (1,25 N) bei 100° verestert und anschliessend bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert. Durch Vergleich mit Standard-, D- und L-Alanin liess sich zeigen, dass das isolierte Alanin praktisch reine L-Form darstellt. Der Anteil von ca. 1,5% D-Form entspricht dem üblichen Wert an Racemisierung bei der Hydrolyse.

*Synthese von DL-2-Amino-4-methylphosphino-buttersäure:* – a) *Methyl-dichlor-phosphin (I)* wurde nach [8] dargestellt. Zu 185 g  $\text{AlCl}_3$  und 85 g  $\text{PCl}_3$  in einem Kolben mit Rückflusskühler wurden 35 g gekühltes  $\text{CH}_3\text{Cl}$  getropft. Zu dem gebildeten Komplex  $\text{CH}_3\text{-PCl}_2\text{-Al}_2\text{Cl}_7^-$  wurden 12,5 g Al-Späne gegeben und die Mischung vorsichtig bis zum Einsetzen der Reaktion erhitzt. Durch Kühlen mit Eiswasser wurde die Reaktion kontrolliert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das auf Zimmertemperatur abgekühlte Gemisch mit 160 g NaCl versetzt. Durch fraktionierte Destillation erhält man ca. 50 g I als bei 78–81° siedende Flüssigkeit.

b) *Methanphosphonigsäure-diäthylester (II):* Unter Anwendung eines Verfahrens von Hoffmann & Moore [17] wurde zu einer Lösung von 50 g Methyl-dichlor-phosphin in 200 ml Diäthyläther tropfenweise eine Mischung von 80 g Pyridin und 50 g Äthanol ( $\text{H}_2\text{O}$ -frei) unter Rühren gegeben. Dabei wurde durch Kühlung mit Eiswasser die Innentemperatur bei 20–30° gehalten. Es wurde noch 3 Std. bei Raumtemperatur unter Durchleiten von trockenem Stickstoff gerührt. Die Lösung wurde vom ausgefallenen Pyridin-hydrochlorid abfiltriert, das mit kaltem Äther gewaschen wurde. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Äther befreit, wobei eine schwach gefärbte Flüssigkeit zurückblieb. Beim Destillieren unter 12 Torr gingen bei 38–40° ca. 50 g II von ca. 90% Reinheit (Gas-Chromatographie) über.

c) *N,O-bis-Trifluoracetyl-DL-Homoserin (III):* 5 g DL-Homoserin (Schuchardt, München) wurden in 150 ml Methylenchlorid und 50 ml Trifluoressigsäureanhydrid 2 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde im Rotationsverdampfer eingedampft. Das zurückbleibende Öl wurde nicht weiter gereinigt.

d) *2-Trifluoracetyl-amino-4-brom-buttersäure (IV):* Das in c) erhaltene Produkt wurde in 100 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach dreistündigem Einleiten von trockenem HBr und 15stündigem Stehen wurde die Lösung im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand, ein schwach gefärbtes Öl, wurde zwecks Entfernung der restlichen Trifluoressigsäure nach Zugabe von je 20 ml  $\text{CCl}_4$  zweimal im Rotationsverdampfer eingedampft. Nach Zugabe von 50 ml Äther und 20stündigem Stehenlassen bei –30° fiel ein kristalliner Niederschlag aus, von dem abfiltriert wurde. Wie die GC.-MS.-Untersuchung zeigte, handelt es sich bei dem kristallinen Produkt um 2-Trifluoracetyl-amino-butyrolacton. Nach Eindampfen der Ätherlösung blieben ca. 2,5 g 2-Trifluoracetyl-amino-4-brom-buttersäure (IV) in Form eines schwach gefärbten Öls zurück, das, wie die GC.-MS.-Untersuchung zeigte, zu mindestens 90% einheitlich war.

e) *2-Trifluoracetyl-amino-4-brom-buttersäure-methylester (V):* Eine Lösung von 200 mg des nach d) erhaltenen Öls in 200  $\mu$ l Benzol wurde mit einem Überschuss an ätherischer Diazomethanol-Lösung versetzt. Nach Eindampfen im Stickstoffstrom wurde der Rückstand (Ester V) in 200  $\mu$ l Benzol aufgenommen.

f) *2-Amino-4-methylphosphino-buttersäure (VI)*: Die Lösung von V in Benzol wurde mit 200  $\mu$ l Methanphosphonigsäure-diäthylester (II) 3 Std. in einem Schraubdeckelgläschen mit Teflonscheibe auf 100° erhitzt. Es bildeten sich 2 Schichten, von denen die obere das Kondensationsprodukt (s. Schema S. 229) enthielt, wie die GC.-MS.-Analyse (Fig. 7) zeigte. Diese obere Schicht wurde eingedampft; der Rückstand wurde mit 200  $\mu$ l 5N wässriger NaOH 3 Std. bei 100° erhitzt. Danach wurde mit Essigsäure neutralisiert und eingedampft. Wie die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, enthielt der Rückstand neben VI noch Homoserin. Er wurde in 1 ml eines Gemisches von Äthanol, H<sub>2</sub>O, Essigsäure (4:1:1 Volumina) gelöst und auf eine Kieselgelsäule (5  $\times$  1,5 cm, 0,05–0,2 mm Korngrösse, Merck) aufgetragen. Es wurde mit der obigen Mischung eluiert und 2-ml-Fractionen gesammelt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Fractionen zeigte, dass VI Homoserin-frei in den Fractionen 13–20 eluiert wurde, während das Homoserin in den Fractionen 5–10 auftrat. Durch Gefriertrocknung der Fractionen 13–20 wurden 28 mg VI erhalten.

*Edman-Abbau und elektrophoretische Untersuchung des Antibioticums.* – a) *Edman-Abbau*: Entsprechend den Vorschriften von *Edman & Begg* [18] und *Blombäck* und Mitarb. [19] wurden 10 mg Antibioticum in 0,4 ml Pyridin-Dimethylallylamin-Trifluoressigsäure-Puffer, pH 9 (Sequencer Grade, Beckman Instr.) gelöst. Nach Zufügen von 25  $\mu$ l Phenylisothiocyanat wurde die Mischung 4 Std. bei 40° unter Stickstoff inkubiert. Nach wiederholter Extraktion mit Benzol wurde die Lösung gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 15 Min. Stehen bei 40° wurde die Trifluoressigsäure im Stickstoffstrom entfernt und das 2-Anilino-5-thiazolinon-Derivat der N-terminalen Aminosäure mit 1-Chlorbutan extrahiert. Der Rückstand dieses Extraktes wurde mittels Hochspannungspapierelktrophorese auf Identität mit L-Alanin bzw. L-Alanyl-L-Alanin untersucht.

Der Überstand wurde im Stickstoffstrom eingedampft. Der Rückstand wurde mit 0,2 ml 1N HCl 10 Min. auf 80° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das 3-Phenyl-2-thiohydantoin-(PTH)-Derivat mit Essigester extrahiert. Die aus dem Extrakt beim Stehenlassen im offenen Reagenzglas auskristallisierende Substanz wurde massenspektrometrisch als PTH-Phosphinothricin identifiziert.

b) *Hochspannungspapierelktrophoresen*: Durchgeführt mit einem Gerät der Firma *Gilson Medical Electronics*, Middleton, Wisconsin, unter Varsol; Puffer: 0,6N Pyridinacetat, pH 3,6; Dauer: 1 Std. Das Antibioticum wandert unter den angegebenen Bedingungen zur Anode.

*Papierchromatographie*: Durchgeführt nach der «fingerprint»-Methode auf *Whatman-3-MM* Papier im Laufmittel *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5).

*In-vivo-Versuche*: Es wurden die bei *Povalla* [20] beschriebenen Versuchsanordnungen des Kreuztests und des Biophotometers angewandt.

Wirkung von Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin und Phosphinothricin auf Glutaminsynthetase: Es wurde die Anordnung nach *Kingdon et al.* [21] verwendet. Testansatz: Pro ml 50 mMol Imidazol/HCl-Puffer mit pH 7,1, 7,6 mMol ATP, 1,0 mMol Phosphoenolpyruvat, 10 mMol NH<sub>4</sub>Cl, 50 mMol MgCl<sub>2</sub>, 0,35 mMol NADH, 25  $\mu$ g Pyruvatkinase, 50  $\mu$ g Lactatdehydrogenase und 0,26 Einheiten Glutaminsynthetase aus *Escherichia coli* (eine Einheit Glutaminsynthetase wandelt in 10 Min. 1  $\mu$ Mol Glutamat in Glutamin um). Die Glutamatkonzentrationen lagen zwischen 2 und 200 mMol. In diesem Testansatz bewirkte Tripeptid in Konzentrationen bis 400  $\mu$ g/ml keine Hemmung der Glutaminsynthetase. Phosphinothricin wurde in Konzentrationen von 7,77  $\mu$ M bzw. 77,7  $\mu$ M eingesetzt. Bei einer Inkubationstemperatur von 30° wurde die Abnahme der NADH-Konzentration am *Eppendorf*-Spektralphotometer mit angeschlossenem Schreiber bei 366 nm verfolgt. Aus den erhaltenen Kurven wurde jeweils die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  ( $\mu$ Mol NAD<sup>+</sup>/Ansatz/10 Min.) ermittelt und in einem *Lineweaver-Burk*-Diagramm gegen die Glutaminkonzentration aufgezeichnet. In diesem Versuch bewirkte Phosphinothricin eine kompetitive Hemmung der Glutaminsynthetase. Die Inhibitorkonstante liegt bei  $K_i = 5,9 \cdot 10^{-6}$ .

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 97. Mitteilung: *H. Pape*, Arch. Mikrobiol. (im Druck).
- [2] *F. Shahrokhi & C. W. Gehrke*, J. Chromatog. 36, 31 (1968); *E. Gelpi, W. A. König, J. Gibert & J. Oro*, J. Chromatog. Sci. 7, 604 (1969).
- [3] *W. A. König, W. Parr, H. A. Lichtenstein, E. Bayer & J. Oro*, J. Chromatog. Sci. 8, 183 (1970).

- [4] J. A. McCloskey, R. N. Stillwell & A. M. Lawson, *Analyt. Chemistry* **40**, 233 (1968).  
 [5] C. W. Gehrke & D. L. Stalling, *Separ. Sci.* **2**, 101 (1967).  
 [6] W. C. Butts & W. T. Rainey, Jr., *Analyt. Chemistry* **43**, 538 (1971).  
 [7] F. Jungnickel, *J. Chromatog.* **31**, 617 (1967).  
 [8] S. L. Manatt, G. L. Juvinall, R. I. Wagner & D. D. Eleman, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2689 (1966).  
 [9] Houben-Weyl, «Methoden der Organischen Chemie», Bd. XII/1, S. 306, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1963.  
 [10] A. Arbusov, *C. 1910 II*, 453.  
 [11] E. Bayer & W. A. König, *J. Chromatog. Sci.* **7**, 95 (1969).  
 [12] F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel & K. Kun Sun, *Z. Naturforschung* **20b**, 1169 (1965).  
 [13] D. Hendlin, W. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, F. J. Wolf, T. W. Miller, L. Chalet, F. M. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, J. M. Mata, S. Hernandez & S. Mochales, *Science* **6**, 122 (1969); E. O. Stapley, D. Hendlin, J. M. Mata, M. Jackson, H. Wallick, S. Hernandez, S. Mochales, S. A. Currie & R. M. Miller, *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1969**, 284; M. Jackson & E. O. Stapley, *ibid.* **1969**, 291; D. Hendlin, B. M. Frost, E. Thiele, H. Kropp, M. E. Valiant, B. Pelak, B. Weissberger, C. Cornin & A. K. Miller, *ibid.* **1969**, 297.  
 [14] R. Tschesche, F. X. Brock & I. Duphorn, *Tetrahedron Letters* **1968**, 2905; R. Tschesche, D. Lenoir & H. L. Weidenmüller, *ibid.* **1969**, 141; K. H. Wallhäuser, G. Neseemann, P. Prave & A. Steigler, *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1965**, 735; G. Huber, U. Schacht, H. L. Weidenmüller, J. Schmidt-Thomé, J. Duphorn & R. Tschesche, *ibid.* **1965**, 737; F. L. Weisenborn, J. L. Bouchard, D. Schmidt, F. Pansy, G. Maestrone, G. Miraglia & E. Meyers, *Nature* **213**, 1092 (1967); A. I. Laskin, W. M. Chan, D. A. Schmith & E. Meyers, *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1967**, 251; E. Meyers, G. J. Miraglia, D. A. Smith, H. I. Basch, F. E. Pansy, W. H. Trejo & R. Donovick, *Applied Microbiology* **16**, 603 (1968); E. Meyers, D. S. Slusarchyk, J. L. Bouchard & F. L. Weisenborn, *J. Antibiotics* **22**, 490 (1969); W. A. Slusarchyk, J. A. Osband & F. L. Weisenborn, *J. Amer. chem. Soc.* **92**, 4486 (1970); S. Takahashi, A. Okanishi, R. Utahara, K. Nitta, K. Maeda & H. Umezawa, *J. Antibiotics* **23**, 48 (1970); H. Umezawa, *ibid.* **23**, 321 (1970); W. A. Slusarchyk, *Biotechn. Bioengineering* **13**, 399 (1971).  
 [15] W. Keller-Schierlein, K. Poralla & H. Zähler, *Arch. Mikrobiol.* **67**, 339 (1969).  
 [16] R. Hütter, «Systematik der Streptomyceten», *Bibliotheca Microbiol.*, Fasc. 6, Karger, Basel 1967.  
 [17] F. W. Hoffman & T. R. Moore, *J. Amer. chem. Soc.*, **80**, 1150 (1958).  
 [18] P. Edman & G. Begg, *European J. Biochemistry* **1**, 80 (1967).  
 [19] B. Blombäck, M. Blombäck, P. Edman & B. Hessel, *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 371 (1966).  
 [20] K. Poralla, Dissertation, Universität Tübingen 1966.  
 [21] H. S. Kingdon, J. S. Hubbard & E. R. Stadtman, *Biochemistry* **7**, 2123 (1968).

## 26. The Acidity of Malondialdehyde and the Stability of its Complexes with Nickel(II) and Copper(II)

by M. M. Osman

Laboratorium für Anorganische Chemie der ETH Zürich and Chemistry Department, Faculty of Science, Alexandria University, Egypt<sup>1)</sup>

(17. XI. 71)

*Summary.* The acidity of malondialdehyde as well as the stability of its 1:1-complexes with Ni<sup>II</sup> and Cu<sup>II</sup> have been determined (Table). In comparison with the enolates of aliphatic  $\beta$ -diketones the anion C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> has not only a strikingly reduced basicity, but is also a grossly inferior ligand for metal cations.

<sup>1)</sup> Present address, Faculty of Education, Chemistry Department, University of Libya, Tripoli, Libya.