

Untersuchungen über ein antifungales Hexaenantibiotikum, Hexamycin. II

## Eigenschaften des Hexamycins

Von K. EISENBRANDT

Mit 7 Abbildungen

### Inhaltsübersicht

Das UV-Spektrum des Hexamycins besitzt Maxima bei 336, 356 und 376 nm. Im IR-Spektrum ist die typische Bande der Makrolid-Polyenantibiotika bei  $1712\text{ cm}^{-1}$  enthalten. Der Schmelzpunkt beträgt  $120\text{--}125^\circ\text{C}$ , das Äquivalentgewicht 824, die Molmasse liegt zwischen 700 und 800. Hexamycin ist in polaren organischen Lösungsmitteln löslich und unlöslich in Wasser und nicht polaren Lösungsmitteln. Lösungen der Substanz verlieren ihre antibiotische Aktivität sowohl durch Erhitzen als auch bei längerem Stehen. Von 21 geprüften Mikroorganismen, vorwiegend Pilze, werden weit über die Hälfte durch  $2\text{--}32\text{ }\mu\text{g/ml}$  gehemmt. Der Einfluß des Hexamycins auf die Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität ist gering. Die Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen wird durch Hexamycin beträchtlich gemindert.

In einer vorausgegangenen Mitteilung<sup>1)</sup> wurde über die Produktion, Isolierung und Reinigung eines neuen Hexaenantibiotikums, Hexamycin, berichtet. Der vorliegende Beitrag beschäftigt sich mit den physikalischen und biologischen Eigenschaften dieses Antibiotikums.

### 1. Physikalische Eigenschaften

Die UV-Absorptionskurve des Hexamycins (Abb. 1) zeigt den typischen Verlauf der Hexaenantibiotika<sup>2)</sup>. Sie enthält Maxima bei 336 ( $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 176$ ), 356 (233) und 376 (232) sowie eine breitere Bande bei 300 nm (168). Absorption bei 300 nm konnte bei mehreren Polyenantibiotika beobachtet werden. Auffällig ist das Auftreten dieser Bande bei allen Hexaenantibiotika. Auch Cryptocidin<sup>3)</sup>, das kristallin erhalten werden konnte, absorbierte in diesem

<sup>1)</sup> K. EISENBRANDT, J. prakt. Chem. [4] **38**, 9 (1968).

<sup>2)</sup> W. OROSHNIK, L. C. VINNING, A. D. MEBANE u. W. A. TABER, Science (Washington) **121**, 147 (1954).

<sup>3)</sup> J. M. J. SAKAMOTO, J. Antibiotics (Tokyo) **12A**, 21 (1959).

Bereich. Für einen „cis-peak“ scheint diese Bande zu intensiv, sie müßte zudem bei kürzeren Wellenlängen liegen. OROSHNIK und MEBANE<sup>4)</sup> halten es für möglich, daß der Grund hierfür in einer  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}$ -Gruppierung liegt.

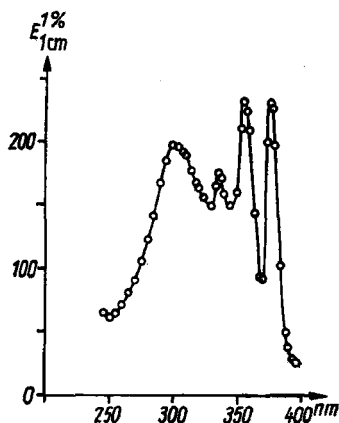


Abb. 1. UV-Spektrum des Hexamycins

In Abb. 2 ist das IR-Spektrum<sup>5)</sup> des Hexamycins dargestellt. Absorptionsstellen liegen bei: 3400, 2955, 2950, 2920, 2870, 1712, 1670, 1600, 1461, 1380, 1260, 1070 und 980  $\text{cm}^{-1}$ . Danach kann mit mehreren  $\text{CH}_2$ -, wenigen  $\text{CH}_3$ -Gruppen, einigen Hydroxylresten und einer Ketofunktion gerechnet werden. Von Bedeutung ist die Bande bei 1712  $\text{cm}^{-1}$ , die die meisten Polyenantibiotika besitzen. Annähernd in diesem Bereich absorbieren  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ester oder Lactone. Als Ursache für die Verschiebung dieser Bande in den Polyenantibiotika nahm DUTCHER<sup>6)</sup> ein makrozyklisches Lacton an. Die Strukturaufklärung des Pimaricins<sup>7) 8)</sup>, des Fungichromins<sup>9)</sup> und des Filipins<sup>10)</sup> sowie die Ermittlung der Teilstrukturen einiger anderer Polyenantibiotika bestätigten dies<sup>11-13)</sup>.

<sup>4)</sup> W. OROSHNIK u. A. D. MEBANE, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe **21**, 17 (1963).

<sup>5)</sup> Den Herren Dr. G. MALEWSKI und Dipl.-Chem. H.-J. WEIGMANN vom Institut für Optik und Spektroskopie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin möchte ich für die Anfertigung und Auswertung der Aufnahmen danken.

<sup>6)</sup> J. D. DUTCHER, monographs of therapy, Squibb. Inst. Med. Res., New Brunswick, N. J. **2**, 87 (1957).

<sup>7)</sup> O. CEDER, Acta Chem. Scand. **18**, 126 (1964).

<sup>8)</sup> B. T. GOLDING, R. W. RICKARDS, W. E. MEYER, J. B. PATRICK u. M. BARBER, Tetrahedron Letters **30**, 3551 (1966).

<sup>9)</sup> A. C. COPE, R. K. BLY, E. P. BURROWS, O. CEDER, E. CIGANEK, B. T. GILLIS, R. F. PORTER u. H. E. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2170 (1962).

<sup>10)</sup> B. T. GOLDING u. R. W. RICKARDS, Tetrahedron Letters **37**, 2615 (1964).

<sup>11-13)</sup> s. S. 22.

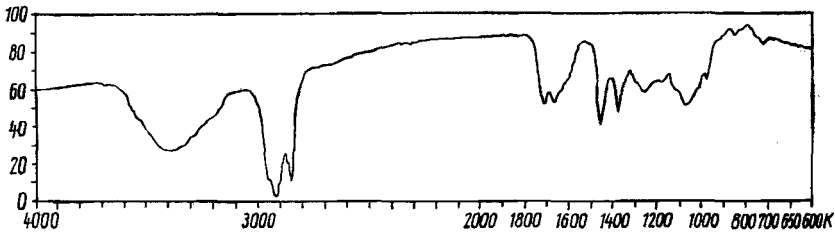


Abb. 2. IR-Spektrum des Hexamycins

Tabelle 1

$R_F$ -Werte des Hexamycins in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel <sup>14)</sup>	$R_F$ -Werte
dest. H <sub>2</sub> O	0,06
n-Heptan	0,03
Petroläther (40–60 °C)	0,03
Ligroin (d <sub>20</sub> 0,706–0,716)	0,05
Benzol	0,03
Toluol	0,04
Cyclohexan	0,06
Äthylchlorid	0,05
Chloroform	0,05
Tetrachlorkohlenstoff	0,05
Methylenchlorid	0,08
Diäthyläther	0,03
Äthylacetat	0,03
Methylacetat	0,07
Aceton (100proz.)	0,06
Dioxan (90proz.)	0,32
n-Butanol/H <sub>2</sub> O gesättigt	0,45
Äthanol (90proz.)	0,94
Methanol (90proz.)	0,96
Aceton (50proz.)	0,96
Phenol (80proz.)	0,93
Dimethylformamid (90proz.)	0,95
Pyridin (90proz.)	0,96

<sup>11)</sup> A. J. BIRCH, C. W. HOLZAPFEL, R. W. RICKARDS, C. DJERASSI, P. C. SEIDEL, M. SUZUKI, J. W. WESTLEY u. J. D. DUTCHER, Tetrahedron Letters **23**, 1491 (1964).

<sup>12)</sup> A. C. COPE, E. B. BURROWS, M. E. DERIEG, S. MOON u. W.-D. WIRTH, J. Amer. chem. Soc. **87**, 5452 (1965).

<sup>13)</sup> E. BOROWSKI, W. MECHLINSKI, L. FALKOWSKI, T. ZIMINSKI u. J. D. DUTCHER, Roczniki Chem. **41**, 61 (1967).

<sup>14)</sup> Alle mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel wurden vorher mit Wasser gesättigt.

Die  $R_F$ -Werte einer Substanz lassen Rückschlüsse auf seine Löslichkeit zu. In Tab. 1 sind die  $R_F$ -Werte des Hexamycins in verschiedenen Lösungsmitteln zusammengefaßt. Danach sollte Hexamycin in polaren Lösungsmitteln wie Alkoholen, Dimethylformamid, Phenol und Pyridin löslich und in Wasser und nichtpolaren organischen Lösungsmitteln wie Petroläther, Äther, Chloroform, Methylacetat und Benzol unlöslich sein. Die beim Arbeiten mit dem Hexamycin gemachten Erfahrungen stimmten damit gut überein. Entsprechendes Löslichkeitsverhalten zeigen die bisher beschriebenen Hexaenantibiotika Cryptocidin<sup>3)</sup>, Endomycin B<sup>15)</sup>, Flavacid<sup>16)</sup> und Mediocidin<sup>17)</sup>. Gewisse Abweichungen treten gegenüber Cryptocidin auf, das in Äthanol nur schwach löslich ist und Endomycin B, das sich sowohl in Laugen als auch in Säuren löst.

Die  $R_F$ -Werte des Hexamycins in Methanol und Äthanol nahmen mit steigendem Wassergehalt der Lösungsmittel ab. Anders verhielten sich n-Butanol und tert.-Amylalkohol. Hier stieg die Löslichkeit, sobald die Lösungsmittel mit Wasser gesättigt waren.

Die Abhängigkeit der  $R_F$ -Werte vom pH der Chromatographiepapiere — pH-Papierchromatographie<sup>18)</sup> — ist in Tab. 2 für drei verschiedene Lösungsmittel zusammengestellt. Danach besitzt Hexamycin sauren Charakter.

Tabelle 2  
pH-Papierchromatographie des Hexamycins in 3 verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	pH der Papierchromatogramme				
	1,50	3,95	5,90	7,45	9,95
n-Butanol/H <sub>2</sub> O gesättigt	0,59	0,40	0,35	0,26	0,17
Methanol (90proz.)	0,94	0,84	0,85	0,83	0,55
Dioxan (90proz.)	0,33	0,31	0,28	0,23	0,07

Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Elektrophorese. Bei Phosphatpuffer pH 8,0 erfolgte geringe Wanderung der Substanz zur Anode.

Hexamycin ist oberflächenaktiv. Suspensionen bzw. Lösungen von 0,5 mg Hexamycin/ml Phosphatpuffer pH 5,4; 6,0 und 7,0 verminderten

<sup>15)</sup> D. GOTTLIEB, P. K. BHATTACHARYYA, H. E. CARTER u. H. W. ANDERSON, *Phytopathology* **41**, 393 (1951).

<sup>16)</sup> I. TAKAHASHI, *J. Antibiotics (Tokyo)* **6A**, 117 (1953).

<sup>17)</sup> Y. OKAMI, R. UTAHARA, S. NAKAMURA u. H. UMEZAWA, *J. Antibiotics (Tokyo)* **7A**, 98 (1954).

<sup>18)</sup> V. BETINA u. P. NEMEC, *Nature (London)* **187**, 1111 (1963).

die Oberflächenspannungen um 33%. Bei pH 8,0 nahm sie um 40% ab. Dies kann vermutlich auf die bessere Löslichkeit des Hexamycins in alkalischen Lösungen zurückgeführt werden.

Die antibiotische Aktivität von Hexamycinlösungen wird sowohl durch Erhitzen als auch beim längeren Stehen vermindert (Tab. 3, Abb. 3). Wesentlich beständiger ist die Substanz in fester Form. Selbst nach zweijähriger Lagerung in einer Kühlzelle bei 4 °C war die fungizide Wirkung kaum gemindert.

Tabelle 3  
Thermostabilität des Hexaenantibiotikums

Zeit in Minuten	Hemmhofdurchmesser in mm bei °C			
	60	80	90	100
30	30,5	30,0	28,3	25,7
60	28,3	28,5	26,2	22,3
120	24,0	23,5	23,0	20,5

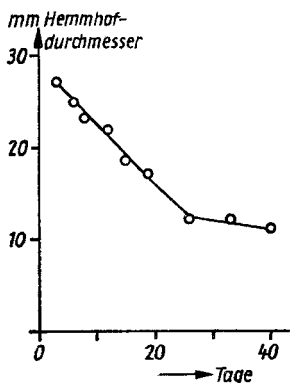


Abb. 3. Diffusionskurve des Hexamycins (*Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.)

Der Schmelzpunkt des Hexamycins liegt bei 120–125 °C (Zers.). Lösungen des Antibiotikums in Methanol, Dimethylformamid, tert.-Amylalkohol und Eisessig zeigten kein optisches Drehvermögen  $[\alpha]_{20}^D = 0$ , ( $c = 1\%$ ).

Das nach BARGER bestimmte Molekulargewicht liegt zwischen 700 und 800. Zwischenwerte ließen sich nicht mit Sicherheit ermitteln, da die Änderung der Flüssigkeitsmenisken in diesem Bereich zu gering war. Die Werte tendierten jedoch mehr zu 760 als zu 730.

Die Molekulargewichte der meisten Polyenantibiotika liegen um 700 und 1000. Zusammenhänge zwischen der Anzahl von Doppelbindungen und den Molekulargewichten scheinen nicht zu bestehen. So gehört z. B.

das Tetraenantibiotikum Pimaricin<sup>19)</sup> zur ersten und das gleichfalls 4 Doppelbindungen enthaltende Fungicidin<sup>20)</sup> zur zweiten Gruppe.

Das Äquivalentgewicht beträgt 824. Die Bestimmung erfolgte in 50proz. Methanol durch Titration mit 0,01 n NaOH.

## 2. Biologische Eigenschaften

Ein wichtiges Merkmal eines Antibiotikums ist sein Wirkungsspektrum. Es ermöglicht den Vergleich mit anderen Antibiotika und gibt Hinweise über die Anwendungsbreite. Das Wirkungsspektrum des Hexamycins zeigt Tab. 4.

Von den 22 in vitro geprüften Mikroorganismen wurden weit über die Hälfte von 2—32 µg/ml des Antibiotikums gehemmt. Bei 5 von ihnen waren

Tabelle 4  
Wirkung des Hexamycins auf verschiedene Mikroorganismen

Mikroorganismus	Geringste wachstumshemmende Konzentration (µg/ml)
<i>Alternaria brassicae</i> (Berk.) Sacc.	2—4
<i>Ascochyta pinodella</i> Jones	120
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem	32—64
<i>Botrytis allii</i> Munn.	2—4
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	0,1—0,5
<i>Cercospora beticola</i> Sacc.	2—4
<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ell. et Arth.	8—16
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G. Sm.) Sacc.	8—16
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl.	32—64
<i>Gibberella fujikuroi</i> (Saw.) Sacc.	32—64
<i>Helminthosporium papaveris</i> Saw.	1—2
<i>Nectria cinnabarina</i> (Tode) Fr.	8—16
<i>Penicillium expansum</i> (Link) Thom	16—32
<i>Penicillium granulatum</i> Bainier	4—8
<i>Penicillium notatum</i> Westling	16—32
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	2—4
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.)	2—4
<i>Thielaviopsis basicola</i> (B. et Br.) McCormick	16—32
<i>Trichothecium roseum</i> (Bull.) Lk.	16—32
<i>Verticillium albo-atrum</i> Rke. et Barth.	32—64
<i>Bacillus subtilis</i> COHN emend. Prazmowski	16—32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	4—8

<sup>19)</sup> A. P. STRUYK, I. HOETTE, G. DROST, J. M. WAISVISZ, T. VAN EEK u. J. C. HOOGHEIDE, *Antibiotics Annu.* 1957—1958, 878 (1958).

<sup>20)</sup> E. L. HAZEN u. R. BROWN, *Science* (Washington) 112, 423 (1950).

mehr als  $32 \mu\text{g/ml}$  notwendig. Auffallend war, daß das Wachstum von *Botrytis cinerea* Pers. bereits von  $0,1-0,5 \mu\text{g/ml}$  verhindert wurde. Als Bakterium wurde allein *Bacillus subtilis* Cohn emend. Prazmowski geprüft. Die geringste wachstumshemmende Konzentration betrug 16 bis  $32 \mu\text{g/ml}$ .

Hexamycin verhielt sich damit ähnlich wie die Hexaenantibiotika Cryptocidin, Endomycin B, Flavacid und Mediocidin. Sie hemmten das Wachstum von Pilzen in etwa gleich großen Konzentrationen. Außer *Bacillus subtilis* wurden andere Bakterien von den Hexaenen nicht oder nur bei sehr hohen Konzentrationen gehemmt. Ein ausführlicher Vergleich der Eigenschaften des Hexamycins mit den bereits beschriebenen Hexaenantibiotika erfolgte an anderer Stelle<sup>21)</sup>.

Für alle qualitativen und quantitativen Untersuchungen des Hexamycins benutzten wir *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. als Testorganismus. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser

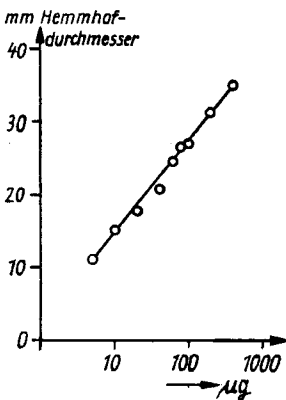


Abb. 4. Aktivitätsabfall einer wäßrigen Hexamycinsuspension

vom Logarithmus der Antibiotikumkonzentrationen dargestellt. Die erhaltene Kurve verlief im untersuchten Konzentrationsbereich geradlinig. Die untere Nachweisgrenze betrug  $5 \mu\text{g/Papierscheibchen}$ . Die Diffusionskurve diente als Eichkurve, um die Konzentrationen der im Papierscheibchentest geprüften Hexamycinlösungen zu ermitteln. Sie kann außerdem — bei gleichen Testorganismen — zum Vergleich mit bereits bekannten Antibiotika herangezogen werden.

Die Diffusion des Hexamycins in Agar war vom pH des Mediums abhängig. Die Hemmhofdurchmesser stiegen bei pH 8 und 9 an. Vermutlich kann die Zunahme der Hemmhofdurchmesser auf die saure Natur des Anti-

<sup>21)</sup> K. EISENBRANDT, H. J. MÜLLER u. M. KLINKOWSKI, Z. allg. Mikrobiol., im Druck.

biotikums zurückgeführt werden. In alkalischen Medien nimmt die Löslichkeit zu.

Erfolgte die Diffusion des Antibiotikums durch Acetylcellulosestreifen, waren die Hemmhöfe gegenüber der Kontrolle vermindert. Nach einer Expositionsdauer von 3, 5, 7 und 24 Stunden betragen die Mittel der Hemmhofdurchmesser 57, 67, 70 bzw. 72% der jeweiligen Kontrolle.

Um einige Hinweise über den Wirkungsmechanismus des Hexamycins zu erhalten, wurde der Einfluß des Wirkstoffes auf die Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität und auf die Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen ermittelt. Die Wirkung auf die Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität frischer Meerrettichextrakte war gering (Abb. 5).

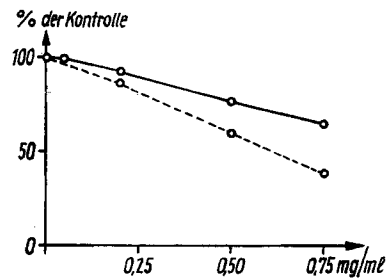


Abb. 5. Einfluß des Hexamycins auf Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität, — Peroxydase, — — — Polyphenoloxydase

Gegenüber der Kontrolle ohne Antibiotikum verminderten 0,75 mg/ml (etwa  $10^{-3}$  molar) die Polyphenoloxydase bzw. Peroxydaseaktivität um 61 bzw. 35%.

Typische Hemmstoffe dieser Enzyme wie Cyanid, Sulfid, Azid usw. wirken bereits in wesentlich geringeren Konzentrationen ( $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  molar) (HOFFMANN-OSTENHOFF 1954)<sup>22</sup>). Ein direkter Einfluß des Hexamycins auf die Polyphenoloxydase und Peroxydase schien daher unwahrscheinlich. Vermutlich wurde die beobachtete geringe Minderung der Aktivitäten durch nichtenzymatische Reduktionswirkung verursacht. Ähnliche Untersuchungen über andere Polyenantibiotika liegen nicht vor.

Die Atmungsversuche mit *Saccharomyces cerevisiae* erfolgten in Anlehnung an Arbeiten von LAMPEN, MORGAN und SLOCUM<sup>23</sup>), DROUHET, HIRTH und LEBEURIER<sup>24</sup>), HENIS und GROSSOWICZ<sup>25</sup>), TSUKAHARA<sup>26</sup>) und GOTTLIEB und Mitarbeiter<sup>27</sup>). Sie stellten eine beträchtliche Minderung der

<sup>22</sup>) O. HOFFMANN-OSTENHOFF, Enzymologie, Springer-Verlag, Wien 1954.

<sup>23</sup>) J. O. LAMPEN, E. R. MORGAN u. A. SLOCUM, J. Bacteriol. **74**, 297 (1957).

<sup>24</sup>) E. DROUHET, L. HIRTH u. G. LEBEURIER, Ann. N. Y. Acad. Sci. **89**, 134 (1960).

<sup>25</sup>) Y. HENIS u. N. GROSSOWICZ, J. gen. Microbiol. **23**, 345 (1960).

<sup>26</sup>) T. TSUKAHARA, Jap. J. Microbiol. **4**, 181 (1960).

<sup>27</sup>) D. GOTTLIEB, H. E. CARTER, J. H. SLONEKER, LUNG, CHI WU u. E. GAUDY, Phytopathology **51**, 321 (1961).



Atmung und Glykolyse von *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Candida albicans* (Robin) in Gegenwart von Fungicidin, Amphotericin B, Heptomycin, Trichomycin und Filipin fest.

Mit Hilfe der Warburgapparatur wurde die Atmungsintensität von *S. cerevisiae* in den Substraten Glucose, Äthanol, Natriumacetat, Natriumlactat und Natriumpyruvat bei verschiedenen Antibiotikumkonzentrationen gemessen. In den Substraten Glucose und Pyruvat wurde die Sauerstoffaufnahme durch 1,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hexamycin stimuliert. Höhere Konzentrationen wirkten hemmend. Bei Natriumlactat und Äthanol verursachte bereits die geringste Konzentration Hemmung, während bei Verwendung von Natriumacetat mit steigender Antibiotikumkonzentration die Sauerstoffaufnahme

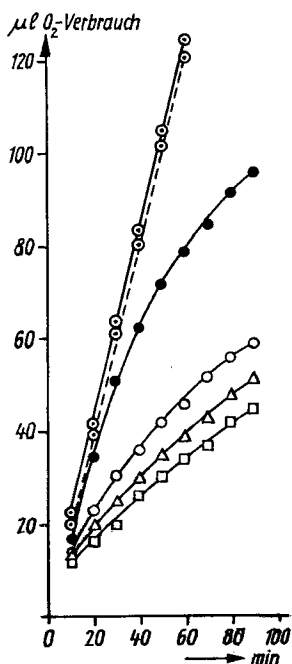


Abb. 6. Einfluß verschiedener Hexamycinkonzentrationen auf die Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen

- 1,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,
- 3,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,
- 4,7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,
- △—△—△ 6,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,
- 7,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,
- Kontrolle

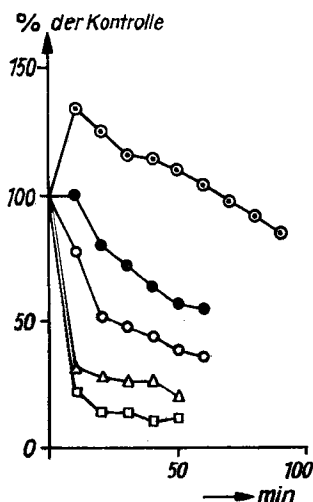


Abb. 7. Hemmung der Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen durch 6,3  $\mu\text{g}$  Hexamycin/ml in verschiedenen Substraten

- Na-Acetat,
- Na-Pyruvat,
- Glukose,
- △—△—△ Na-Lactat,
- Äthanol

geringfügig zunahm. (Verglichen wurde der Sauerstoffverbrauch nach 50 Minuten.) Abb. 6 zeigt den Einfluß des Hexamycins auf die Atmung von *S. cerevisiae* in Gegenwart von Glucose. In Abb. 7 ist die prozentuale Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch  $6,3 \mu\text{g}$  Antibiotikum/ml Reaktionsflüssigkeit in den verschiedenen Substraten dargestellt.  $6,3 \mu\text{g}$  Hexaen-antibiotikum verursachten nach 50 Minuten bei Äthanol 88proz., bei Natriumacetat 81proz., bei Glucose 62proz. und bei Pyruvat 43proz. Hemmung. Im Substrat Natriumacetat trat 10proz. Stimulierung ein.

Zu vergleichbaren Ergebnissen führten die Untersuchungen mit Nystatin<sup>23</sup>), Amphotericin B<sup>24</sup>), Heptamycin<sup>25</sup>), Trichomycin<sup>26</sup> und Filipin<sup>27</sup>).

Die bisherigen Arbeiten über den Wirkungsmechanismus der Polyenantibiotika führten zu folgenden Vorstellungen<sup>28</sup>)<sup>29</sup> u. a.): Primär wird durch die Polyenantibiotika die Permeabilität der Zellmembranen verändert. Erst als Folge davon treten Hemmung der Atmung und Glykolyse sowie eine Reihe anderer Veränderungen im Inneren der Zelle ein. Für die Bindung der Polyenantibiotika an die Zellmembranen konnten von KINSKY<sup>30</sup>), LAMPEN und Mitarbeiter<sup>31</sup>), RAZIN<sup>32</sup>) u. a. Sterine nachgewiesen werden. Die Veränderung der Permeabilität beeinflußt u. a. in starkem Maße den  $\text{K}^+$ -Haushalt. Die Zellen verarmen an  $\text{K}^+$ . Bei einer Reihe Polyenantibiotika konnte die Hemmung des Wachstums von Pilzen durch Erhöhung der  $\text{K}^+$ - und  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration — nicht durch die  $\text{Na}^+$ -Konzentration — aufgehoben werden. LAMPEN und ARNOW<sup>33</sup>) unterschieden auf Grund der Wirkung auf *Mycoplasma gallisepticum* kleine Polyenantibiotika mit 34—37 und große mit 46—47 C-Atomen. Nur bei letzteren wird die Hemmung durch  $\text{K}^+$ - oder  $\text{NH}_4^+$ -Gaben aufgehoben. Die bisher spezifischste Wirkung besitzt Perimycin<sup>34</sup>), ein „großes“ Heptaenantibiotikum. Nach Untersuchungen von BOROWSKI und CYBULSKA<sup>35</sup>) mit N-Succinylperimycin und den Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* Hansen und

<sup>28</sup>) J. O. LAMPEN, In Fungus and Fungus Diseases, Symp. Z. N. Y. Acad. Med., Sec. Microbiol. Springfield, III. USA.: C. C. THOMAS, (1962).

<sup>29</sup>) S. C. KINSKY, Antimicrobial Agents and Chemother. **1963**, 387 (1964).

<sup>30</sup>) S. C. KINSKY, Proc. nat. Acad. Sci. (Washington), **48**, 1049 (1962).

<sup>31</sup>) J. O. LAMPEN, J. W. GILL, P. M. ARNOW u. J. MAGANA-PLAZA, J. Bacteriol. **86**, 945 (1963).

<sup>32</sup>) S. RAZIN, Biochem. Biophys. Acta (Amsterdam), **78**, 771 (1963).

<sup>33</sup>) J. O. LAMPEN u. P. M. ARNOW, Bull. Res. Counc. Israel, A, **11**, 286 (1963).

<sup>34</sup>) E. BOROWSKI, C. P. SCHAFFNER, H. LECHEVALIER u. B. S. SCHWARTZ, Antimicrobial Agents Annu. **1960**, 532.

<sup>35</sup>) E. BOROWSKI u. B. CYBULSKA, Vortrag während des Intern. Symp. „Wirkungsmechanismen von Fungiziden und Antibiotika“, Reinhardtsbrunn v. 2.—7. 5. 1966.

*Candida albicans* (Robin) hemmt dieses einzig und allein den aktiven  $K^+$ -Transport und wirkt damit auf  $K^+$ -abhängige Systeme der Zelle. Das führt schließlich zum Tod der Zellen infolge K-Mangels.

## Experimenteller Teil

### 1. Ermittlung der physikalischen Eigenschaften

Für die UV-Absorptionsmessungen stand ein Universalspektrophotometer des VEB Carl Zeiss Jena zur Verfügung.

Die IR-Spektren wurden im Institut für Optik und Spektroskopie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin (s. S. 2) in Form von KBr-Preßlingen im UR 10 des VEB Carl Zeiss Jena aufgenommen.

Sowohl für die Papierchromatographie als auch für die Elektrophorese wurde Papier der Sorte FN Niederschlag/Erzgeb. verwendet. Auf den Startpunkt wurden 0,1 ml einer methanolischen Lösung des Hexamycins (1 mg/ml) unter Kaltluft aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 18 cm. Die Chromatogramme wurden anschließend getrocknet und bioautographisch entwickelt. Hierfür fanden Spiegelglasplatten,  $25 \times 33$  cm, und Aluminiumrahmen,  $2,5 \times 20,5 \times 29,5$  cm, Verwendung. Sie wurden im Trockenschrank 2–3 Stunden bei  $150^\circ$  sterilisiert. Auf die durch die Aluminiumrahmen begrenzte Fläche wurde unter sterilen Bedingungen 300 ml auf  $45$ – $50^\circ\text{C}$  abgekühlter Pepton-Glucose-Agar gegossen. Im Pepton-Glucose-Agar befanden sich 5 ml Sporensuspension eines *Fusarium culmorum*-Schrägröhrenchens. Sobald der Agar erstarrt war, konnten die mit Kaltluft getrockneten Papierchromatogramme aufgelegt werden. Die abgedeckten Platten standen 48 Stunden bei  $25^\circ\text{C}$ .

Für die pH-Papierchromatographie wurden Papierstreifen vorher in Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McLOANE pH 1,5; 3,95; 5,90 und 7,45 und Borsäure-Puffer nach CLARK und LUBS pH 9,95 (pH-Werte der Puffer mit pH-Meter gemessen) getränkt und an der Luft getrocknet.

Auf der Mitte eines  $15 \times 18$  cm großen Papierstreifens wurden strichförmig (2,5 cm) je 0,1 ml einer Lösung von 1 mg Hexamycin/ml Methanol aufgetragen und mit 1/15 m Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 5 bzw. 8 befeuchtet. Elektrophorese erfolgte bei 200 Volt und Phosphatpuffer pH 5 und 8 (210 Minuten). Die Stromstärke betrug am Anfang 15 mA, am Ende 52 mA. Anschließend wurden die Pherogramme getrocknet und bioautographisch entwickelt.

Nach der von EUCKEN und SUHRMANN<sup>36)</sup> angegebenen Blasenmethode wurde die Oberflächenspannung bestimmt. Eine zu einer feinen Spitze ausgezogene Pipette ( $r = 0,00824$  cm) ragte 1 cm tief ( $h'$ ) in die zu messende Lösung. Der Druck über der Kapillare war so bemessen, daß sich pro Sekunde eine Blase bildete. Sobald er den höchsten Wert erreichte, wurde die Druckdifferenz an dem mit Wasser gefüllten Manometer abgelesen. Die Oberflächenspannung ließ sich nach

$$\sigma = \frac{r}{2} (\Delta p - \rho \cdot h' \cdot g)$$

$r$  = Radius der Kapillare,

$\Delta p$  = Maximaldruck, der das Abstoßen der Luftblase bewirkte,

$\rho$  = Dichte der zu messenden Lösung,

$h'$  = Eintauchtiefe,

$g$  = Erdbeschleunigung

berechnen.

<sup>36)</sup> A. EUCKEN u. R. SUHRMANN, Physikalisch-Chemische Praktikumsaufgaben. Akademische Verlagsgesellschaft, Geest und Portig K.-G., Leipzig, 1952.

Zu jeweils 10 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN pH 5,4; 6,0; 7,0 und 8,0 wurden 5 mg Hexamycin gegeben und die Oberflächenspannung gemessen. Als Kontrollen dienten die gleichen Lösungen ohne Antibiotikum.

Zur Ermittlung der Thermostabilität dienten je 2 ml einer 2 mg/ml n-Butanol enthaltenden Antibiotikumlösung, die 30, 60 und 120 Minuten bei 60, 80, 90 und 100°C im Thermostaten erhitzt wurden. Danach erfolgte von 0,1 ml der einzelnen Lösungen Aktivitätsbestimmungen im Papierscheibchentest. Sporen eines Hafermehlagar-Schrägröhrchens von *Fusarium culmorum* wurden in 5 ml sterilem Wasser suspendiert und mit 150 ml flüssigem, auf 45–50°C abgekühltem Pepton-Glucose-Agar vermischt. Davon gelangte so viel in sterile Petrischalen, daß eine etwa 0,5 cm dicke Schicht entstand. Pro Platte wurden anschließend 2 antibiotikumhaltige Papierscheibchen (10 mm Ø) auf den erstarrten PG-Agar gelegt und 48 Stunden bei 25°C bebrütet.

In einer anderen Versuchsordnung wurden 15 mg Hexamycin in 1 ml Methanol gelöst und zu 5 ml Wasser gegeben. In diese Suspension wurden je 4 Papierscheibchen (10 mm Ø) nach 3, 6, 8, 12, 15, 19, 26, 33 und 40 Tagen eingetaucht, mit Filterpapier abgetupft und auf mit *Fusarium culmorum* beimpfte Platten gelegt. Vor dem Bebrüten bei 25°C standen die Petrischalen 1 Stunde bei 2°C. Die Antibiotikumsuspension stand während des Versuches verschlossen am Fenster eines Arbeitsraumes

Für die Bestimmung der optischen Aktivität stand ein Kreispolarmeter des VEB Carl Zeiss Jena zur Verfügung. Als Lichtquelle diente eine Natriumdampflampe. 1proz. Lösungen des Antibiotikums in Methanol, tert.-Amylalkohol, Eisessig und Dimethylformamid wurden in einer 1 dm langen Mikropolarimeterröhre bei Zimmertemperatur gemessen.

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach einer von PREGL und ROTH<sup>37)</sup> beschriebenen Methode. 1proz. Lösungen des Hexamycins in Methanol wurden in Kapillaren mit methanolischen Lösungen von Azobenzol folgender Molaritäten verglichen: 0,0333, 0,0250, 0,0200, 0,0167, 0,0143, 0,0137, 0,0132, 0,0125 und 0,0111. Aus einer großen Zahl Schmelzpunktröhrchen wurden diejenigen mit einem Durchmesser von 0,95 mm ausgewählt. In abwechselnder Reihenfolge wurden zwischen Luftblasen Tröpfchen der Substanzlösung und Azobenzollösung gleicher Molarität eingefüllt. Jede Kapillare enthielt 11 durchschnittlich 0,35 mm große Tröpfchen, von denen nur die mittleren 7 ausgewertet wurden. Nach Zuschmelzen der Kapillaren gelangten sie in Petrischalen mit Wasser, um kurzzeitige Temperaturschwankungen soweit wie möglich auszuschalten. Sofort danach und 14 Stunden später wurden die Abstände der Flüssigkeitsmenisken mikroskopisch bei 180facher Vergrößerung auf 8 µ genau abgelesen. Zwischenwerte konnten auf etwa 4 µ abgeschätzt werden. Zur Berechnung des Molekulargewichtes dienten die Lösungen, die die geringsten Abweichungen zeigten, bzw. bei denen sich das Vorzeichen der Änderung umkehrte. Dies trat bei 0,0143 und 0,0125 molaren Azobenzollösungen ein.

Das Äquivalentgewicht wurde nach PREGL und ROTH<sup>37)</sup> bestimmt. Die Methode wurde dahingehend erweitert, daß unter CO<sub>2</sub>-freiem Stickstoff titriert wurde. Für gute Durchmischung der Titrierflüssigkeit diente ein Magnetrührer. Pro Ansatz wurden 3 ml einer Stammlösung von 10 mg Hexamycin/ml Methanol mit 2 Tropfen einer 1proz. Phenolphthaleinlösung und 2 ml 50proz. Methanol mit 0,01 n NaOH titriert. Die Substanz verbrauchte 1,213 ml 0,01 n NaOH. Der Fehler der Methode, hervorgerufen durch hohen Alkoholgehalt und hohes Äquivalentgewicht, dürfte bei 5–6% liegen.

<sup>37)</sup> F. PREGL u. H. ROTH, Quantitative organische Mikroanalyse, Springer-Verlag, Wien, 1949, 6. Aufl.

## 2. Ermittlung der biologischen Eigenschaften

Für die Bestimmung des Wirkungsspektrums verwendeten wir den Strichtest. In sterile Petrischalen wurden 0,025; 0,125 und 0,25 ml einer 0,1 mg/ml enthaltende Hexamycinfösung bzw. 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,25 und 1,33 ml einer Lösung von 2 mg/ml pipettiert und mit jeweils 25 ml 45–50 °C warmem Hafermehlagar vermischt. Der erstarrte Hafermehlagar wurde anschließend mit je 4 Testorganismen beimpft, indem die Sporen mit einer Impfnadel strichförmig auf die Platte aufgetragen wurden. Nach 60 Stunden erfolgte Auswertung der bei 25 °C bebrüteten Platten. Als geringste Hemmstoffkonzentration wurde die angegeben, bei der der Testorganismus nicht gewachsen war.

Mit Hilfe des Papierscheibchentests wurde die Diffusionskurve ermittelt. Auf die Papierscheibchen wurden unter Kaltluft 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 und 1,0 ml einer methanolischen Lösung des Hexamycins (1 mg/ml) bzw. 0,1 und 0,2 ml einer Lösung mit 2 mg Antibiotikum/ml aufgetragen. Bevor die Platten 48 Stunden bei 25 °C bebrütet wurden, standen sie 12 Stunden bei 2 °C.

Für die pH-abhängige Diffusion wurde flüssiger, auf 50–60 °C abgekühlter Pepton-Glucose-Agar mit HCl bzw. NaOH gegen Universal-pH-Papier auf pH 3, 5, 6, 7, 8 und 9 eingestellt und in Petrischalen mit 1 ml einer Sporensuspension von *Fusarium culmorum* vermischt. Auf die Platten wurden je 2 Papierscheibchen (10 mm Ø) mit 100 µg Antibiotikum aufgelegt und 48 Stunden bei 25 °C bebrütet.

Diffusion durch Acetylcellulosefolie erfolgte in der Weise, daß zwischen mit *Fusarium culmorum* beimpften Pepton-Glucose-Agar und Papierscheibchen (10 mm Ø), die 100 µg Antibiotikum enthielten, Folie gelegt wurde. Nach 1, 3, 5, 7 und 24stündiger Einwirkungsdauer bei 4 °C wurden die Papierscheibchen abgenommen und die Platten 48 Stunden bei 25 °C bebrütet.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte in Anlehnung an die von OPEL, WOLFFGANG und KEGLER<sup>38)</sup> beschriebene Methode. Statt der dort benutzten virusinfizierten Gurkenpflanzen wurden die Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität in frischem Meerrettich ermittelt. Meerrettich wurde mit Wasser gereinigt, in kleine Würfel zerschnitten und 2 g mit der doppelten Menge Seesand und 3 ml destilliertem Wasser zerrieben. Nach Überführung in ein Zentrifugenglas mit weiteren 2 ml destilliertem Wasser erfolgte 15minütige Sedimentation bei 5000 g. Der Überstand wurde mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. In 2 ml dieses Extraktes wurden nach der oben zitierten Methode die Polyphenoloxydase- und Peroxydaseaktivität in Gegenwart verschiedener Hexamycinkonzentrationen bestimmt.

Die Versuchsanordnung zur Messung der Atmung von *Saccharomyces cerevisiae* entsprach der von BELOSERSKI und PROSKURJAKOW<sup>39)</sup> angegebenen. Für die Untersuchungen wurde Preßhefe verwendet. Nach der von UMBREIT, BURRIS und STAUFFER<sup>40)</sup> angegebenen Methode wurden die Gefäß- und Manometerkonstanten ermittelt. Einarmige Warburggefäße befanden sich in einem auf 25 °C eingestellten Wasserbad und wurden mit 120 Schwingungen/min geschüttelt. Als Sperrflüssigkeit diente eine Lösung von 46 g NaCl, 10 g Fit-Pulver und einigen Tropfen Fuchsin in 1 l destilliertem Wasser. Im inneren Einsatz der Gefäße befanden sich 0,2 ml 10proz. KOH und im Hauptraum 0,005, 0,010, 0,015, 0,020 und 0,025 ml einer 1 mg/ml Dimethylformamid enthaltenden Hexamycinfösung,

<sup>38)</sup> H. OPEL, H. WOLFFGANG u. H. KEGLER, *Phytopath. Z.* **42**, 62 (1961).

<sup>39)</sup> A. N. BELOSERSKI u. N. I. PROSKURJAKOW, *Praktikum der Biochemie der Pflanze*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1956.

<sup>40)</sup> W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS u. J. F. STAUFFER, *Manometric techniques*, Burgess Publishing Co. Minneapolis, 1957, 3. Aufl.

1,5 ml der Hefesuspension (400 mg Preßhefe/100 ml Zitronensäure-Phosphat-Puffer pH 4,4 nach McILOAINE) und 1,5 ml 0,15 molare wäßrige Substratlösung (Glucose, Äthanol, Na-Acetat, Na-Lactat, Na-Pyruvat). Statt der Antibiotikumlösung besaß die Kontrolle 0,015 ml reines Dimethylformamid. Vor den Messungen wurden die Gefäße 15 Minuten bei geöffnetem Manometerhahn equilibriert. Ein Gefäß diente als Thermobarometer.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. RIECHE danke ich für das große Interesse an dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. M. KLINKOWSKI für die Anregung der Arbeit und die stete Anteilnahme und Herrn Dr. H. WOLFFGANG für die großzügige Unterstützung und wertvollen Hinweise. Frau INKEN STOLLE danke ich für die technische Assistenz. Fräulein HANNA-CHRISTA NORDMANN sowie Fräulein URSULA BRUNNE bin ich für die Anfertigung der photographischen Aufnahmen und Herrn A. SAHLMANN für die Zeichnung der Abbildungen zu Dank verpflichtet.

Aschersleben, Institut für Phytopathologie der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. M. KLINKOWSKI).

Bei der Redaktion eingegangen am 11. Oktober 1967.