

Bromothricin¹

Das von einem Stamm von *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN und WOODRUFF) WAKSMAN und HENRICI 1948, Stamm Tü 99, gebildete Antibiotikum Chlorothricin, $C_{50}H_{68}ClO_{16}$, besitzt als chlorhaltigen Baustein einen Rest der 5-Chlor-2-methoxy-6-methylbenzoesäure **1**, der über eine Esterbindung an eine Zuckerkomponente gebunden ist². Daneben produziert der gleiche Stamm das entsprechende chlorfreie Antibiotikum Deschlorothricin mit einem Rest der Säure **2** als Baustein. Durch Züchtung des Stammes Tü 99 auf der früher beschriebenen Nährlösung, der zusätzlich 5 g Kaliumbromid pro Liter beigefügt waren, haben wir geprüft, ob der Aktinomyzete in der Lage ist, Brom anstelle von Chlor in das Antibiotikum einzubauen. Die nach 96 h geerntete Kultur (10 l) wurde nach dem für das Chlorothricin angegebenen Verfahren aufgearbeitet. Nach einer 600stufigen Craig-Verteilung (Lösungsmittel wie beim Chlorothricin²) wurden 1,64 g eines nahezu farblosen amorphen Pulvers erhalten, das sich nicht umkristallisieren liess. Bei der Dünnschichtchromatographie verhielt sich das Produkt einheitlich und zeigte den gleichen Rf-Wert wie das kristallisierte Chlorothricin-Deschlorothricin-Gemisch².

Um zu untersuchen, ob sich ein bromhaltiges Analoges des Chlorothricins gebildet hatte, wurden 400 mg Antibiotikum mit Schwefelsäure in Methanol abgebaut (Bedingungen wie beim Chlorothricin). Durch Chromatographie an Kieselgel wurden 83 mg Methanolyseprodukt B', 37 mg Mischfraktion und 114 mg Methanolyseprodukt C erhalten. Das letztere wurde durch Umkristallisieren aus Azeton-Äther in farblosen Kristallen (Smp. 227–228°) gewonnen und erwies sich nach Mischsmp., IR-Absorptionsspektrum und Rf-Wert als identisch mit dem entsprechenden Abbauprodukt des Chlorothricins.

Das Methanolyseprodukt B', das gemäss Dünnschichtchromatographie einheitlich war und sich nahezu gleich verhielt wie das Methanolyseprodukt B aus Chlorothricin, wurde mit alkoholischer Natronlauge verseift und die mit Wasser verdünnte alkalische Lösung mehrmals mit Äthylazetat ausgezogen. Es wurden 13 mg blassgelbes Öl erhalten, das nach Dünnschichtchromatographie identisch war mit dem α -Methylglykosid der 2-Desoxy-D-rhamnose aus Chlorothricin².

Aus der alkalisch-wässrigen Lösung wurden nach Ansäuern und Ausziehen mit Äthylazetat 39 mg Säuren erhalten. Nach dem Verestern mit Diazomethan zeigte ein Dünnschichtchromatogramm die Anwesenheit von 2 Substanzen mit Rf 0,44 und 0,36 an (Kieselgel, Chloroform als Fließmittel, Entwicklung mit Joddampf). An einer Säule aus 6 g Kieselgel (vierstufige Multibore-Kolonne³) wurden mit absolutem Chloroform als Elutionsmittel 18,5 mg 5-Brom-2-methoxy-6-methylbenzoesäure-methylester **4** und anschliessend 12,5 mg 2-Methoxy-6-methylbenzoesäure-methylester **5** als chromatographisch einheitliche farblose Flüssigkeiten erhalten und durch Destillation im Hochvakuum gereinigt. Die Identifizierung des Esters **5** erfolgte durch das IR-Absorptionsspektrum und das Massenspektrum² mit $M^+ = 180$ ($C_{10}H_{12}O_3$) und weiteren charakteristischen Signalen bei m/e 162 und 148.

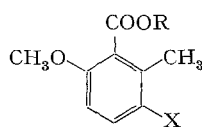
Die Zusammensetzung des bromhaltigen Esters **4** folgte aus dem Massenspektrum mit $M^+ = 258$ ($I_{258}:I_{260}$ ca. 1:1) für $C_{10}H_{11}BrO_3$ und weiteren charakteristischen Signalen bei m/e 243, 226 und 214. Die Lage der Substituenten geht daraus hervor, dass das NMR-Spektrum (100 MC MHz) mit dem des chlorhaltigen Esters **3**² weitgehend übereinstimmt: δ 2,30 ppm (s, 3H; Ar-CH₃), 3,80 ppm (s, 3H; OCH₃), 3,91 ppm (s, 3H; OCH₃), 6,65 ppm (d, $J = 8,5$ Hz, 1H; Ar-H), 7,75 ppm (d, $J =$

8,5 Hz, 1H; Ar-H). Einzig das Signal des zum Halogenatom o -ständigen Wasserstoffatoms (δ 7,75 ppm) ist bei der Bromverbindung **4** gegenüber dem Chloranalogen **3** um 0,45 ppm nach tieferem Feld verschoben, was etwa der Erwartung entspricht⁴. Die IR-Absorptionsspektren der beiden Ester **4** und **3** sind ebenfalls sehr ähnlich.

Die für den chlorhaltigen Ester **3** charakteristischen Massenzahlen im Massenspektrum bzw. dessen charakteristische NMR-Signale² (δ 7,30 ppm) sind in den Spektren des Esters **4** nicht erkennbar. Auch wurde bei der Chromatographie des rohen Estergemisches keine dem Ester **3** entsprechende Fraktion erhalten. Der Einbau von Chlor in das Antibiotikum wird demnach bei Anwesenheit eines starken Überangebots von Bromidionen in der Nährlösung stark zurückgedrängt. Das Verhältnis von Bromothricin zu Deschlorothricin betrug im untersuchten Produkt ca. 3:2, während das Verhältnis Chlorothricin zu Deschlorothricin bei den früheren Proben² durchwegs höher war.

Ein Einbau von Brom anstelle von Chlor unter besonderen Kulturbedingungen ist schon früher bei anderen Gruppen von Antibiotika beobachtet worden, zum Beispiel beim Griseofulvin⁵ und in der Tetracyclinreihe⁶.

Das untersuchte Gemisch von Bromothricin und Deschlorothricin (ca. 3:2) zeigt im Plattendiffusionstest mit *Bacillus subtilis* eine antibiotische Wirkung, die etwa 50–75% derjenigen des Chlorothricins entspricht². Die Wirkung kann im Kreuztest mit einem Lipoprotein aus Eigelb aufgehoben werden.



	X	R
1:	Cl	H
2:	H	H
3:	Cl	CH ₃
4:	Br	CH ₃
5:	H	CH ₃

Summary. *Streptomyces antibioticus* (WAKSMAN und WOODRUFF) WAKSMAN und HENRICI 1948, strain Tü 99, produced Bromothricin instead of Chlorothricin, when it was grown in a nutrient medium containing 0.5% potassium bromide. The properties of bromothricin are very close to those of chlorothricin. Its nature was elucidated by degradation to methyl 5-bromo-2-methoxy-6-methylbenzoate.

W. KELLER-SCHIERLEIN, R. MUNTWYLER und H. ZÄHNER

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz), und Institut für Biologie, Lehrbereich Mikrobiologie der Universität Tübingen (Deutschland), 16. Mai 1969.

¹ 79. Mitteilung der Reihe Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen; 78. Mitteilung: W. KELLER-SCHIERLEIN, K. PORALLA und H. ZÄHNER, Arch. Mikrobiol., im Druck.

² W. KELLER-SCHIERLEIN, R. MUNTWYLER, W. PACHE und H. ZÄHNER, Helv. chim. acta 52, 127 (1969).

³ G. A. FISCHER und J. J. KABARA, Analyt. Biochemistry 9, 303 (1964).

⁴ Y. NOMURA, Y. TAKEUCHI und N. NAKAGAWA, Tetrahedron Letters 1969, 639.

⁵ J. MACMILLAN, J. chem. Soc. 1954, 2585.

⁶ A. P. DOERSCHUK, P. A. MILLER, J. R. D. MCCORMICK, B. A. BITLER, J. J. GOODMAN, E. R. JENSEN, S. A. SZUMSKI, M. A. PETTY, J. A. GROVICH und A. S. PHELPS, J. Am. chem. Soc. 78, 1508 (1956); vgl. auch P. SENSI, G. A. DE FERRARI, G. G. GALLO und G. ROLLAND, Farmaco (Pavia), Ed. sci. 10, 337 (1955).