

174. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten.

3. Mitteilung¹⁾.

Nonactin

von R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer,
L. Neipp, V. Prelog und H. Zähler.

(1. VIII. 55.)

Bei Prüfung einer grösseren Anzahl von Streptomyceten auf antibiotische Wirksamkeit fanden wir, dass mehr als 1% der untersuchten Stämme Actidion (Cycloheximid)²⁾ erzeugen. Die meisten von unseren Actidion-Produzenten, soweit sie bisher auf systematische Zugehörigkeit untersucht wurden, sind ähnlicher obwohl nicht ganz übereinstimmend mit *Streptomyces viridochromogenes* (Krainsky) Waksman et Henrici oder *Streptomyces olivochromogenes* (Bergey et al.) Waksman et Henrici als mit *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman et Henrici, welcher in der Literatur als Actidion-Produzent angegeben wird³⁾.

Ein solcher Stamm, ETH. 7796, erzeugte auf verschiedenen Nährlösungen neben dem Actidion eine neutrale, farblose, kristalline Verbindung vom Smp. 147–148°, die keine nennenswerte antibiotische Wirksamkeit zeigt und von uns deshalb Nonactin genannt wurde.

Die Analyse zeigte, dass das Nonactin die Zusammensetzung $(C_{10}H_{16}O_3)_n$ besitzt; es enthält kein nach Zeisel bestimmbares Alkoxyl und keine aktiven Wasserstoffe nach Zerewitinoff. Die ebullioskopische Molekulargewichtsbestimmung in Aceton führte zur Formel $C_{30}H_{48}O_9$. Auf diese Formel berechnet sind wenigstens 6 nach Kuhn-Roth nachweisbare C-Methyl-Gruppen anwesend.

Im UV. ist nur ein schwaches Absorptionsmaximum bei 264 m μ ($\log \varepsilon = 1,5$) zu sehen. Im IR.-Absorptionsspektrum (vgl. Fig.) fehlen die für Hydroxyl-Gruppen typischen Banden im 3 μ -Gebiet, was im Einklang mit dem Fehlen der aktiven Wasserstoffe nach Zerewitinoff steht. Im 6 μ -Gebiet ist nur eine starke, scharfe Carbonyl-Bande bei 1726 cm⁻¹ anwesend.

Das Nonactin ist allem Anschein nach optisch inaktiv oder besitzt ein sehr geringes optisches Drehungsvermögen. Es gibt weder mit Tetranitromethan noch mit konz. Schwefelsäure eine Färbung,

¹⁾ 2. Mitt.: Helv. **38**, 1202 (1955).

²⁾ Vgl. B. E. Leach, J. H. Ford & A. J. Whiffen, J. Amer. chem. Soc. **69**, 474 (1947); J. H. Ford & B. E. Leach, ibid. **70**, 1223 (1948); E. C. Kornfeld, R. G. Jones & T. V. Parke, ibid. **71**, 150 (1949).

³⁾ Vgl. S. A. Waksman & H. A. Lechevalier, Actinomycetes and their Antibiotics, The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1953.

es reagiert weder mit Acetanhydrid-Pyridin noch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und verdient somit nicht nur vom biologischen, sondern auch vom chemischen Standpunkt aus seinen Namen. Wir sind zur Zeit mit der Konstitutionsaufklärung dieser interessanten Verbindung beschäftigt.

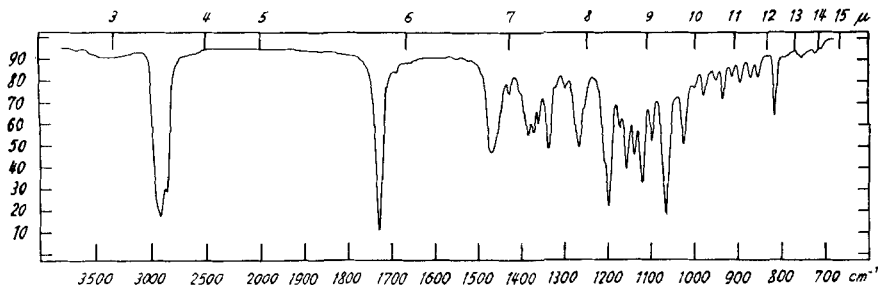


Fig. 1.

Experimenteller Teil.

Beschreibung des Organismus. Der Stamm ETH. 7796 wurde aus einer Bodenprobe vom Egelsee, Kt. Aargau, isoliert, die am 3. 8. 1952 gesammelt wurde.

Synthetischer Agar¹⁾: Wachstum schleierartig, farblos (3 Tage), später grünlichgrau (7 Tage); Luftmycel samtig, erbsengrün bis grünlichgrau; Pigment graugrün und hellbraun.

Synthetische Lösung: Wachstum sehr gut; Sediment, Flocken weissgelb, oberflächliche Pellikel mit grünlichgrauem Luftmycel; Pigment grünlichgelb.

Glucose-Brühe: Spärliches, flottierendes Wachstum; Sediment milchweiss; Luftmycel spärlich; kein Pigment.

Glucose-Agar: Wachstum sehr gut, runzlig, olivgrün (4 Tage) bis grünlichbraun (7 Tage); Luftmycel samtig, grünlichgrau; Pigment hellbraun bis kastanienbraun.

Glucose-Asparagin-Agar: wie auf Glucose-Agar; Pigment jedoch grasgrün.

Calciummalat-Agar: wie auf Glucose-Agar; Pigment grasgrün oder hellbraun.

Gelatinestich (18°): Oberflächliches Wachstum, olivgrün; Luftmycel samtig, erbsengrün bis grünlichgrau; Pigment olivgrün; Verflüssigung 0,6 cm nach 14 Tagen, 2 cm nach 38 Tagen.

Stärkeplatte: Substratmycel schleierartig, dünn, olivgrün; Luftmycel samtig, grünlichgrau; gute Hydrolysierung: 0,5–0,6 cm nach 4 Tagen.

Nähragar: Wachstum runzlig, sattgelb; Luftmycel erst nach 7 Tagen entwickelt, staubig, weissgrau.

Kartoffeln: Wachstum flechtenartig, olivgrün; Luftmycel samtig, grünlichgrau bis erbsengrün; starke Pigmentbildung, olivgrün.

Karotten: wie auf Kartoffeln, jedoch ohne Pigment.

Lackmusmilch: Oberflächliches Wachstum, Pellikel; Luftmycel spärlich, mehlig bestäubt, grauweiss; Gerinnung und Peptonisierung schon nach 3 Tagen, total nach 7 Tagen; Lackmus wird blau.

Temperatur: 18°, Wachstum schwach; 28° und 37° gutes Wachstum; 55° kein Wachstum.

Die Benützung verschiedener Kohlenstoffquellen²⁾ zeigt Tab. 1.

¹⁾ Rezepte und Terminologie wie in Helv. **38**, 938 (1955).

²⁾ Methodik nach T. G. Pridham & D. Gottlieb, J. Bacteriology **56**, 107 (1948).

Tabelle 1.

Kohlenstoffquelle	Wachstum	Kohlenstoffquelle	Wachstum
L-Xylose	+	Inulin	–
L-Arabinose	+	D-Mannit	+
L-Rhamnose	+	D-Sorbit	(–)
D-Fructose	+	Dulcit	–
D-Galaktose	+	Mesoinosit	–
Saccharose	–	Salicin	(–)
Maltose	+	Natriumacetat	(+)
Lactose	–	Natriumcitrat	(+)
Raffinose	–	Natriumsuccinat	+

- + = Gutes Wachstum, sichere Verwendung der betreffenden C-Quelle.
 (+) = Schwaches Wachstum, Verwendung der betreffenden C-Quelle fraglich.
 (–) = Sehr schwaches Wachstum, Verwendung unwahrscheinlich.
 – = Kein Wachstum, keine Verwendung.

Züchtung. Für die Gewinnung von Nonactin wurde Stamm ETH. 7796 in Schüttel- und Gärtankkulturen bei 27° auf einer Glycerin-Sojamehl-Nährlösung folgender Zusammensetzung gezüchtet: 20 g Glycerin, 10 g Sojabohnenmehl, 5 g Natriumchlorid, 1 g Natriumnitrat, 10 g Calciumcarbonat in 1 l Leitungswasser. pH war vor dem Sterilisieren 7,0; die Nährlösung wurde 20 Min. bei 1 atü sterilisiert.

Isolierung. Nach 2 Tagen Wachstum wurde die Kulturflüssigkeit durch eine mit Nylontüchern bespannte Filterpresse durchgedrückt. 61 l Kulturfiltrat extrahierte man bei pH 7,6 in einem Westfalia-Extraktor mit etwa 20 l Äthylacetat. Der Extrakt wurde in einem Dünnschichten-Eindampfer auf etwa 1 l konzentriert. Die Filterrückstände extrahierte man mit Aceton und dampfte den Extrakt ebenfalls ein. Der wässrige Rückstand wurde mit Äthylacetat ausgezogen und der Auszug mit demjenigen aus dem Kulturfiltrat vereinigt.

Die vereinigten, mit verd. Essigsäure, Natriumcarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Äthylacetat-Extrakte hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 13,2 g Rückstand, der beim Stehen teilweise kristallisierte.

Durch Kristallisation aus etwa 200 cm³ Methanol, liessen sich daraus etwa 2,40 g rohes Nonactin vom Smp. 138–141° abtrennen. Die Mutterlaugen wurden an 200 g Aluminiumoxyd (Aktivität III) chromatographiert. Mit 900 cm³ Benzol wurden zuerst 5,76 g eines gelben, antibiotisch unwirksamen Öles eluiert. 500 cm³ Chloroform eluierten 1,69 g Substanz, die teilweise kristallisierte. Durch Umlösen aus Methanol liessen sich daraus 0,55 g Nonactin isolieren. Schliesslich wurden mit 650 cm³ Chloroform-Methanol (19:1) 0,65 g eines gelben Öles eluiert, welches eine starke Wirksamkeit gegenüber *Candida tropicalis* zeigte. Aus dieser Fraktion konnte das Actidion isoliert werden (s. später), das für die antibiotische Wirksamkeit verantwortlich ist.

Das Nonactin bildete nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol farblose Nadeln vom Smp. 147–148°, die zur Analyse 20 Std. bei 90° im Hochvakuum getrocknet wurden. $[\alpha]_D = 0^\circ \pm 2^\circ$ (c = 1,20, Chloroform).

$C_{30}H_{48}O_9$	Ber. C 65,19	H 8,75	O 26,25	6 CH ₃ (C) 16,31%
		Mol. Gew. 552,68		
	Gef. C 65,21; 65,05	H 8,79; 8,83	O 26,20	CH ₃ (C) 14,38%
		Mol. Gew. 589 ¹⁾		

Das UV.-Absorptionsspektrum wurde in Feinsprit gemessen, das IR.-Absorptionsspektrum (Fig.) wurde in Nujol aufgenommen.

¹⁾ Das Molekulargewicht wurde ebullioskopisch in Aceton-Lösung in einem Apparat nach W. Świątosławski, Bull. Soc. chim. France [4] 41, 717 (1927), bestimmt.

Isolierung von Actidion. Die 0,65 g Chloroform-Methanol-Eluate des Chromatogramms an Aluminiumoxyd (s. oben) wurden in einem automatischen Gegenstromverteilungsapparat über 48 Stufen verteilt, wobei man als Lösungsmittel ein Gemisch von 55 Volumteilen Tetrachlorkohlenstoff, 55 Volumenteilen Chloroform, 75 Volumenteilen Methanol und 25 Volumenteilen Wasser verwendete. Die Fraktionen 19–30 enthielten 139 mg eines öligen Produktes, aus dem durch Lösen in 5 cm³ Äther und Impfen mit einem authentischen Vergleichspräparat 32 mg Actidion kristallisierten, das nach Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther bei 103–109° schmolz, mit dem Vergleichspräparat keine Smp.-Erniedrigung gab und mit diesem auch auf Grund seines IR.-Absorptionsspektrums identisch war.

Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule (Leitung *W. Manser*) ausgeführt; das IR.-Absorptionsspektrum verdanken wir Hrn. Prof. *H. H. Günthard*.

Zusammenfassung.

Aus Kulturfiltrat und Mycel eines *Streptomyces viridochromogenes* oder *Streptomyces olivochromogenes* nahestehenden Streptomyceten wurde neben Actidion eine neutrale, farblose, kristalline Verbindung C₃₀H₄₈O₉, das Nonactin, isoliert, die chemisch wenig reaktiv ist und gegenüber den untersuchten Mikroorganismen unwirksam oder nur schwach wirksam war.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel.

Institut für spezielle Botanik und
Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

175. Stabilität und Kinetik bei Komplexbildungsreaktionen.

IV.¹⁾ Austauschversuche mit

N,N-Di-n-propyl-dithiocarbamat-Metall-Komplexen

von *W. Regenass*, *S. Fallab* und *H. Erlenmeyer*.

(18. VIII. 55.)

N,N-Di-n-propyl-dithiocarbaminsäure bildet mit einer Reihe von Schwermetallionen Komplexverbindungen, die sich als Festkörper von der Formel NiR₂²⁾, ZnR₂, CuR₂ und CoR₃³⁾ isolieren lassen⁴⁾.

¹⁾ I. *P. G. Läger*, *S. Fallab* & *H. Erlenmeyer*, *Helv.* **37**, 1050 (1954); II. *P. G. Läger*, *S. Fallab* & *H. Erlenmeyer*, *Helv.* **38**, 92 (1955); III. *H. Brintzinger*, *S. Fallab* & *H. Erlenmeyer*, *Helv.* **38**, 557 (1955).

²⁾ R[−] = (n-C₃H₇)₂NCSS[−].

³⁾ Bei der Herstellung des Cobalt-Komplexes aus Cobalt(II)-Salzen erfolgt in Lösung stets eine Umsetzung mit dem Luftsauerstoff, so dass bei der Aufarbeitung CoR₃ als Festkörper isoliert wird.

⁴⁾ *L. Malatesta*, *Gazz. chim. ital.* **70**, 541 (1940); *H. J. Cavell* & *S. Sudgen*, *J. chem. Soc.* **1935**, 625.