

NEUE PHENAZINDERIVATE AUS PSEUDOMONAS AUREOFACIENS¹

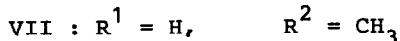
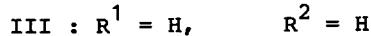
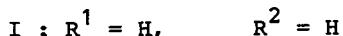
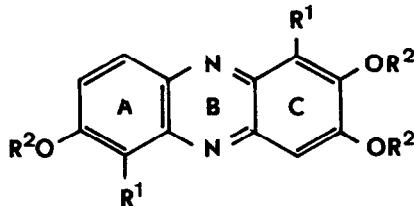
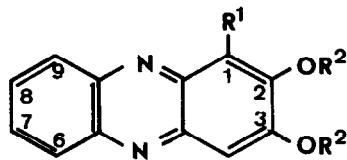
A. Römer und H. Budzikiewicz[†]

Inst. f. Organische Chemie der Universität, 5000 Köln 41, Greinstraße 4, Germany

H. Korth und G. Pulverer

Hygiene-Institut der Universität, 5000 Köln 41, Goldenfelsstraße 21, Germany

Bei der Untersuchung der Inhaltsstoffe eines mutierten Stammes von Pseudomonas aureofaciens fanden wir im Zuge unserer Untersuchungen der Biogenese von Phenazinen neben den schon früher aus der gleichen Species isolierten Verbindungen 2-Hydroxyphenazin², Phenazin-1-carbonsäure³ und 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure⁴ vier weitere Phenazinderivate, und zwar 2,3-Dihydroxyphenazin (I), 2,3-Dihydroxyphenazin-1-carbonsäure (II), 2,3,7-Trihydroxyphenazin (III) und 2,3,7-Trihydroxyphenazin-1,6-dicarbonsäure (IV), über deren Strukturermittlung hier berichtet werden soll.



Die von festem eisenhaltigen Glukonatmedium abgekratzten Bakterien wurden mit Aceton und dann mit Methanol wiederholt digeriert, wobei die drei o.g. bekannten Phenazinderivate in Lösung gingen. Der Zellrückstand wurde mit Methanol/konz. Salzsäure (20 : 1) gerührt, anschließend mit der gleichen Menge Chloroform und der vierfachen Menge Wasser versetzt und hierauf die Chloroformphase über Kieselgur filtriert und eingeeengt. Massenspektroskopische Untersuchung (18 eV) des

Gemisches ergab Molekülionen bei m/e 212, 228, 256 und 316, deren Elementarzusammensetzung durch exakte Massenmessung als $C_{12}H_8N_2O_2$, $C_{12}H_8N_2O_3$, $C_{13}H_8N_2O_4$ und $C_{14}H_8N_2O_7$ (I - IV) bestimmt wurde.

Umsetzung mit Diazomethan/Methanol führte zu einem Massenzuwachs entsprechend der Einführung von 2,3,3 bzw. 5 Methylgruppen (M^+ 240, 270, 298, 386). Das Gemisch der Methylierungsprodukte (V - VIII) wurde mittels HPLC⁵ aufgetrennt. Die UV-, IR-, MS- und NMR-Daten sind in Tab. 1 und 2 zusammengefaßt. VI und VIII wurden mit methanolischer Kaliumhydroxydlösung verseift; die freien Säuren konnten mit Kupfer in Diphenyläther bei 260°C zu V und VII decarboxyliert werden^{4,6}.

Die Stellung der Substituenten bei V - VIII ergab sich aus den NMR-Spektren (s. Tab. 2): bei V und VI findet man für den unsubstituierten Ring das typische Muster eines AA'BB'-Systems bei etwa 8,2 und 7,9 ppm⁷. Bei V, das neben der Ringebene eine weitere Symmetrieebene aufweist, fallen die Signale für H-1 und H-4 (die δ -Werte entsprechen der Nachbarschaft der OCH_3 -Gruppen⁹) zusammen, bei VI tritt entsprechend ein 1-Protonensingulett auf. Analoge Verhältnisse findet man bei VII und VIII für Ring C. AB-Systeme bei 7,42 und 8,03 bzw. 7,64 und 8,30 ppm weisen auf jeweils 2 benachbarte H-Atome, die Größe der Kopplungskonstanten⁸ und die δ -Werte^{1,8,9} auf ein α - und ein β -ständiges H (H-8 und H-9) hin. VII weist zusätzlich ein 1-Protonensingulett auf, das wegen der gleichen Umgebung wie für H-1 und H-4 mit einem dieser Signale zusammenfällt. Die chemischen Verschiebungen der Methoxylsignale bei allen 4 Verbindungen bestätigen deren Stellung an β -C-Atomen (α -ständige Methoxylgruppen zeigen Verschiebung zu tieferem Feld^{1,8,9}).

Die NMR-Daten von VII und VIII erlauben nicht, das isomere 8-Methoxy- bzw. 8-Methoxy-9-carbonsäure-Substitutionsmuster auszuschließen, hiergegen sprechen jedoch biogenetische Überlegungen: alle bisher in der Natur aufgefundenen Phenazinderivate mit 2 C-Substituenten tragen diese an C-1 und C-6^{1,9,10-13} offensichtlich infolge formaler antiparalleler Verknüpfung von 2 Shikimisäureeinheiten¹⁴.

Tab. 1: MS-, UV- und IR-Daten der Verbindungen I - VIII.

| Phenazine | | Summenformel ¹⁵ | λ_{\max} (CH ₃ OH) nm | IR (vC=O) cm ⁻¹ |
|--|------|---|--|----------------------------|
| 2,3-Dihydroxy- | I | C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂ | | |
| 2,3-Dihydroxy-1-carbonsäure | II | C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₄ | 248, 408, 425 | 1675 |
| 2,3,7-Trihydroxy- | III | C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₃ | | |
| 2,3,7-Trihydroxy-1,6-dicarbonsäure | IV | C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₇ | | |
| 2,3-Dimethoxy | V | C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 223, 250, 373, 390 | |
| 2,3-Dimethoxy-1-carbonsäuremethylester | VI | C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₄ | 222, 255, 378 | 1735 |
| 2,3,7-Trimethoxy- | VII | C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃ | 225, 260, 310, 393 | |
| 2,3,7-Trimethoxy-1,6-dicarbonsäure-dimethylester | VIII | C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₇ | 227, 260, 395 | 1735 |

Tab. 2: NMR-Daten der Verbindungen V - VIII.

| Verbindung | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-6 | H-7 | H-8 | H-9 | -CO ₂ CH ₃ | -OCH ₃ |
|------------|-----------|-----|-----|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------|
| V | 7.46 s | - | - | 7.46 s | ~8,2 m | ~7.9 m | ~7.9 m | ~8.2 m | - | 2x4.14 s |
| VI | - | - | - | 7.52 s | ~8.2 m | ~7.8 m | ~7.8 m | ~8.2 m | 4.13 s | 2x4.10 s |
| VII | 7.37 s | - | - | 7.37 s | 7.38 s | - | 7.42 d9,5 | 8.03 d9,5 | - | 2x4.10; 4.01 s s |
| VIII | - | - | - | 7.48 s | - | - | 7.64 d9,6 | 8.30 d9,6 | 2x4.12 s | 3x4.10 s |

Varian EM 390; CDCl₃; δ -Werte in ppm; \jmath in Hz; s = Singulett; d = Dublett; m = Multiplett; die Integrationswerte entsprechen den sich aus den Formelbildern ergebenden Protonenzahlen.

Wir danken für die Aufnahme der Massenspektren Herrn Dr. H. Brzezinka, für die Massenfeinbestimmungen Herrn Dipl.-Chem. G. Feistner und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- 1) Bakterieninhaltsstoffe IV, Teil III: W.Neuenhaus, H.Budzikiewicz, H.Korth und G.Pulverer, *Z. Naturf.*, im Druck
- 2) M.E.Levitch und P.Peitz, *Biochemistry* 5, 689, (1966)
- 3) A.J.Kluyver, *J. Bacteriol.* 72, 406 (1956)
- 4) E.S.Olsen und J.H.Richards, *J. Org. Chem.* 32, 2887 (1967)
- 5) Säulenmaterial: HPLC-Sorb SIL 60-D 10 CN (Macherey-Nagel, Düren); Laufmittel: Hexan/Dioxan und Hexan/i-Propanol wechselnder Zusammensetzung; Detektion: UV bei 270 oder 370 nm.
- 6) I und III decarboxylieren erst beim Sublimieren (ca. 1 Pa) oberhalb von 250°C und verändern sich nicht beim Kochen mit Methanol/konz. Salzsäure. Sie sind deshalb nicht als Artefakte der Aufarbeitung, sondern als Inhaltsstoffe von *Pseudomonas* zu betrachten.
- 7) Die beiden carbocyclischen Ringe des Phenazinsystems wurden als unabhängige Einheiten behandelt. Das gleiche Aufspaltungsmuster wurde auch bei 2-Methoxyphenazin-1-carbonsäuremethylester gefunden⁸.
- 8) P.K.Brooke, S.R.Challand, M.E.Flood, R.B.Herbert, F.G.Holliman und P.N. Ibberson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2248 (1976)
- 9) C.D.Tipton und K.L.Rinehardt, *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 1425 (1970)
- 10) N.N.Gerber, *J. Heterocycl. Chem.* 6, 297 (1969)
- 11) S.Nakamura, E.Lin Wang, M.Murase, K.Maeda und H.Umezawa, *J. Antibiot.*, A, 12, 55 (1959)
- 12) S.Nakamura, K.Maeda und H.Umezawa, *J. Antibiot.*, A, 17, 33 (1964)
- 13) G.S.Byng und J.M.Turner, *J. Gen. Microbiol.* 97, 57 (1976)
- 14) U.Hollstein, D.L.Mock, R.R.Sibitt, U.Roisch und F.Lingens, *Tetrahedron Lett.* 2987 (1978)
- 15) Durch exakte Massenmessung bestimmt (Varian MAT 731).

(Received in Germany 24 November 1978)