

Di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methan – eine Verbindung neuartiger Struktur aus *Pseudomonas aureofaciens* [1]

Di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methane –

A Compound of Novel Structure from *Pseudomonas aureofaciens*

W. Neuenhaus, A. Römer und H. Budzikiewicz*

Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41

H. Korth und G. Pulverer

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

Z. Naturforsch. **35b**, 385–388 (1980); eingegangen am 28. November 1979

Di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methane, Phenazines, Bacterial Constituents, *Pseudomonas aureofaciens*

The structure elucidation of di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methane from *Pseudomonas aureofaciens* is described. In addition to the phenazine derivatives isolated earlier from this bacterium 2,3,4-trihydroxyphenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1,6-dicarboxylic acid could be identified.

Für unsere Untersuchungen über die von *Pseudomonas aureofaciens* gebildeten Phenazinderivate steht sowohl der Wildtyp (Stamm CCEB 517) als auch eine durch Behandeln mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin erzeugte Mutante (Stamm 13 cR) zur Verfügung. Aus der vom Kulturmedium abzentrifugierten Bakterienmasse konnten wir 2-Hydroxy- (1), 2,3-Dihydroxy- (2) und 2,3,7-Trihydroxyphenazin (3), Phenazin-1-carbonsäure (4) und deren 2-Hydroxy- (5) und 2,3-Dihydroxy-derivate (6) sowie 2,3,7-Trihydroxyphenazin-1,6-dicarbonsäure (9) erhalten [2]. Als weiteres Glied dieser Reihe haben wir inzwischen 2,3,4-Trihydroxyphenazin-1-carbonsäure (7) isoliert.

Durch Umsetzen [3] von 7 mit CH_2N_2 erhält man 2,3,4-Trimethoxyphenazin-1-carbonsäuremethylester [4], aus dessen ^1H -NMR-Spektrum sich das Substitutionsmuster ergibt [2]: 4,19 (s, 3H), α - COOCH_3 ; 4,03 und 4,09 (beide s, 3H), β - OCH_3 ; 4,33 (s, 3H), α - OCH_3 ; 7,8–8,4 ppm (m, 4H). Besonders aufschlußreich ist der Aromatenbereich, in dem weder Singuletts noch Dubletts zu erkennen sind, was jedes Substitutionsmuster mit einzelnen Protonen bzw. mit o- oder m-ständigen Protonenpaaren ausschließt. Es ist vielmehr nur das für Phenazinderivate mit einem unsubstituierten Ring typische 4H-Multiplett (7,8–8,4 ppm) zu erkennen.

Im Kulturmedium des Wildtyps fanden sich 4 und 5, in denen der Mutante zusätzlich 1 und Phenazin-1,6-dicarbonsäure (8) (alle identifiziert durch ihre UV-, IR-, NMR- und Massenspektren sowie Vergleich mit authentischem Material) sowie die Di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methan (10), ein Vertreter eines Verbindungstyps, der bisher in der Natur nicht aufgefunden worden ist. Über die Strukturermittlung soll im folgenden berichtet werden.

Die Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$) entspricht zwei Phenazinresten mit zusätzlich zwei O-Atomen und einer CH_2 -Gruppe. Die beiden Hauptfragmente im EI-Massenspektrum – m/e 196 ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$) und 209 ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$) – legen nahe, daß nicht beide O-Funktionen im selben Phenazinrest enthalten sind. Im ^1H -NMR-Spektrum von 10 findet sich ein CH_2 -Singulett bei 5,08 ppm. Da das Methylensignal z.B. bei 1-Hydroxymethylphenazin (12) bei 5,32 ppm beobachtet wird, ist damit eine $-\text{CH}_2-\text{O}-$ oder insbesondere eine $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ Gruppierung, für die Verschiebung zu entsprechend tieferem Feld zu erwarten wäre, unwahrscheinlich. Im Aromatenbereich (12 Protonen) ist u.a. ein Paar von Dubletts (7,65 und 8,09 ppm), das von koppelnden Protonen stammt (j 9,5 Hz), sowie ein 8H-Multiplett zu erkennen. Das UV-Spektrum zeigt Banden bei 268, 371 und 415 nm; die molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 128500, 16200$ und 5180) sind doppelt so groß wie bei einfachen Phenazinen beobachtet.

Mit Diazomethan läßt sich 10 (wohl wegen starker intramolekularer H-Brückenbindung, wofür auch

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

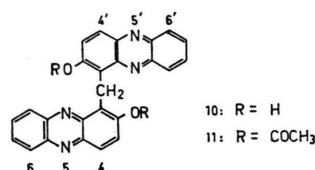
0340-5087/80/0300-0385/\$ 01.00/0

das Fehlen von klar erkennbaren OH-Banden im IR-Spektrum spricht [5]) nicht methylieren, jedoch mit Acetanhydrid/Pyridin in das Diacetat (**11**) überführen. Das ^1H -NMR-Spektrum von **11** (wie auch das von **10**, s.o.) zeigt, daß Signale, die von den beiden Phenazineinheiten stammen, stets paarweise zusammenfallen, was den symmetrischen Bau des Moleküls beweist:

Bei 1,48 ppm tritt ein Acetatsignal (6H) auf (die Lage bei so hohem Feld ergibt sich wohl durch eine Anordnung der Methylgruppen über den aromatischen Ringen), bei 5,70 ppm das Methylen-singulett (2H). Die Verschiebung zu tieferem Feld gegenüber **10** – bedingt durch den Anisotropieeffekt der Carbonylgruppe – legt eine Nachbarstellung der CH_2 - und der OCOCH_3 -Gruppen nahe. Im Aromatenbereich finden sich wieder zwei Dubletts (je 2H) bei 7,51 und 8,22 ppm (j 9 Hz), sowie zwei Multipletts (je 4H) bei 7,8–7,9 und 8,0–8,4 ppm. Die Dubletts (s. auch **10**) müssen wegen der großen Kopplungskonstante von benachbarten Ringprotonen stammen, wobei 1,2-Substitution wegen der Beeinflussung der chemischen Verschiebung der Methylen- durch die Acetatgruppe wahrscheinlicher ist.

Eine Klärung ließ sich durch Überführen von **11** in das 5,5'-Di-N-oxid herbeiführen (wie am Modell des 1-Methylphenazins gezeigt werden konnte, wird nur der sterisch nicht gehinderte Stickstoff oxidiert). In den ^1H -NMR-Spektren von Phenazin-N-oxiden sind die Signale der beiden der N-Oxid-Gruppe benachbarten Ringprotonen gegenüber der Ausgangsverbindung zu tieferem Feld verschoben [6]. (Bei 1-Methylphenazin (**13**) finden sich die Aromatenmultipletts bei 7,6 und 8,3 ppm, bei seinem 5-N-Oxid sind die Signale zweier Protonen nach 8,6–8,7 ppm verschoben. Die Lage des Methylen-signals wird kaum beeinflusst: 2,93 bzw. 2,87 ppm.) Für das Di-N-oxid von **11** ergibt sich das folgende Bild: Dubletts bei 7,38 und 8,57 ppm, ein 2H-Multiplett bei 8,5–8,7 ppm, ein 6H-Multiplett bei 7,6–8,2 ppm. Es ist somit eines der Dubletts ($\text{H-4} + \text{H-4}'$) und ein 2H-Multiplett ($\text{H-6} + \text{H-6}'$) zu tieferem Feld verschoben worden. Das Methylen-signal findet sich bei 5,50 ppm (vgl. oben die Methylen-signale von 1-Methylphenazin und seinem N-Oxid). Daraus folgt – zusammen mit den ^1H -NMR-Ergebnissen bei **10** und **11** –, daß jeweils ein Benzolring der beiden Phenazinteile an C-1 und C-2 substituiert ist.

Das **10** zugrunde liegende Substitutionsmuster



ließ sich schließlich durch Abbau mit Natrium in siedendem Butanol zu **1** und durch oxidative Spaltung [8] mit $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ zu **5** bestätigen. **10** kann durch Kondensation von **1** mit CH_2O synthetisiert werden [9]. Natürliche und synthetische Verbindung erwiesen sich als identisch (IR, NMR, MS).

Tab. I. Aus *Ps. aureofaciens* isolierte Phenazinderivate sowie Umwandlungsprodukte.

Ver- bindung	Substituenten	C-1	C-2	C-3	C-4	C-6	C-7
1			OH				
2			OH	OH			
3			OH	OH			OH
4	COOH						
5	COOH	OH					
6	COOH	OH	OH				
7	COOH	OH	OH	OH			
8	COOH					COOH	
9	COOH	OH	OH			COOH	OH
12	CH_2OH						
13	CH_3						

Experimenteller Teil

Massenspektren: Finnigan 3200 und Varian MAT 731 (exakte Massenmessungen), 70 eV, Direkt-einlaß.

NMR-Spektren: Varian EM 309, δ -Werte; Lösungsmittel: Aceton- d_6 (methyliertes **7**), CDCl_3 (**10**–**12**), CD_2Cl_2 (**11**-di-N-oxid), CCl_4 (**13**) und **13**-N-oxid).

IR-Spektren: Perkin-Elmer 720.

UV-Spektren: Beckmann-Spektrometer 25.

HPLC: Säule HPLC-Sorb SIL 60-D 10 CN, Macherey und Nagel, Düren.

Säulenchromatographie: Kieselgur für GC und Kieselgel 60 (0,04–0,06 mm), beide Merck, Darmstadt.

Mutation: Der Stamm CCEB 517 aus der „Culture Collection of Entomogenous Bacteria, Dept. of

Insect Pathology, Inst. of Entomology, ČAS, Na cvicisti 2, Prag 6th wurde nach der Vorschrift von Adelberg *et al.* [10] mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin behandelt. Eine Kolonie, die sich auf Gluconagarplatten durch besonders intensive Rotfärbung abzeichnete, wurde als Stamm 13 weiter vermehrt und mit Mitomycin C behandelt. Eine durch Silberglanz und unterschiedliche Rotfärbung auffallende Kolonie wurde dann als Stamm 13 cR weiter geführt.

Rohmaterial: Platten aus 4 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g Na-Gluconat, 0,05 g Fe-Citrat und 18 g Bacto-Agar (Difco) (pH 7,4 mit KOH) wurden mit Stamm CCEB 517 bzw. 13 cR von *Pseudomonas aureofaciens* beimpft, 24 h bei 30 °C und anschließend 3 Tage bei Zimmertemperatur bebrütet, abgekratzt und wie in Ref. [2] angegeben extrahiert.

Der Extrakt der Zellrückstände wurde über Kieselgel filtriert und eingengt. Massenspektroskopische Untersuchung [2] (18 eV) des Gemisches ergab Molekülionen bei m/e 212 (2), 224 (4), 240 (5), 256 (6), 272 (7) und 316 (9). Nach Umsetzung mit $\text{CH}_2\text{N}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ wie in Ref. [3] angegeben ließ sich das Gemisch durch HPLC auftrennen (Laufmittel Hexan/Isopropanol 100/1), wobei nacheinander 4-methylester, 2-dimethylether, 7-trimethylether-methylester, 6-dimethylether-methylester, 5-methylether-methylester und 9-trimethylether-dimethylester eluiert wurden.

Der Eindampfrückstand des Extraktes des Kulturmediums von Stamm 517 wurde auf einer Kieselgursäule in eine Hexan- und eine CHCl_3 -Fraktion aufgetrennt, letztere an Kieselgel 60 rechromatographiert. Mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ (5:1) konnte Phenazin-1-carbonsäure (4) (gereinigt durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit Ethylacetat/ CCl_4 2:1, Schmp. 243 °C), mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (5) (gereinigt durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 3:1, Schmp. 210 °C (Zers.), Methylester Schmp. 129 °C) erhalten werden.

Der Eindampfrückstand des Extraktes des Kulturmediums von Stamm 13 cR wurde in gleicher Weise vorgetrennt. Auftrennung der CHCl_3 -Fraktion an Kieselgel 60 mit $\text{CCl}_4/\text{Ethylacetat}$ (2:1) und anschließend $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) ergab nacheinander 10 (s.u.), Phenazin-1-carbonsäure (4), 2-Hydroxyphenazin (1) (gereinigt durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 5:1, Schmp. 186 °C), 2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (5), und Phenazin-1,6-dicarbonsäure (8) (gereinigt durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1, Schmp. 240 °C).

2.3.4-Trimethoxyphenazin-1-carbonsäuremethylester

Massenspektrum [4]: m/e 328,1059 (ber. 328,1060 für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$): M^+ ; m/e 281,0562 (ber. 281,0561 für $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$): $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_3]^+$.

IR (NaCl-Platte): 1735 cm^{-1} (CO). UV (CH_3OH): 374, 262, 220 (Schulter) nm.

NMR: s. Text.

Di-(2-hydroxy-1-phenazinyl)methan (10)

Reinigung durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CCl}_4/\text{Ethylacetat}$ (3:1), Schmp. > 300 °C. Massenspektrum: m/e 404,1278 (ber. 404,1273 für $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$), 55%: M^+ ; 209,0714 (ber. 209,0715 für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$), 65%: 196,0635 (ber. 196,0637 für $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$), 100%: 181, 18%: $[m/e$ 196-CO] $^+$; 168, 38%, $[m/e$ 196-CO] $^+$. UV (CHCl_3) und NMR: s. Text.

Di-(2-acetoxy-1-phenazinyl)methan (11)

10,3 mg 10 wurden mit 1 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin 24 h auf 60 °C erwärmt, mit CHCl_3 versetzt, mit verd. HCl zur Entfernung des Pyridins ausgeschüttelt, mit H_2O gewaschen, getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CCl}_4/\text{Ethylacetat}$ (3:1) ergab 6,1 mg 11, Schmp. > 300 °C. Massenspektrum: m/e 488, 19%: M^+ ; 428, 68%: $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$; 403, 55%: $[\text{M}-\text{CH}_3\text{CO}-\text{CH}_2\text{CO}]^+$, 386, 92%: $[m/e$ 428- $\text{CH}_2\text{CO}]^+$; 385, 100%: $[m/e$ 428- $\text{CH}_3\text{CO}]^+$; 209, 25%: 196, 29%: 181, 8%: 168, 14% (s.o.). IR (KBr-Preßling): 1760 cm^{-1} (Phenolacetat). UV (CHCl_3): 255 (ϵ 110800), 363 (7880). NMR: s. Text.

Di-(2-acetoxy-5-oxido-1-phenazinyl)methan

6,1 mg 11 in 10 ml abs. Benzol wurden mit 4,5 mg *m*-Chlorperbenzoesäure 24 h bei Raumtemperatur gerührt, das Reaktionsgemisch eingengt und an Kieselgel 60 mit $\text{CCl}_4/\text{Ethylacetat}$ (3:1) gereinigt. Ausbeute: 77%, Schmp. 228 °C. Massenspektrum [11]: m/e 520, 19%: M^+ ; 504, 11%: $[\text{M}-\text{O}]^+$; 488, 9%: $[\text{M}-2 \text{O}]^+$ sowie zahlreiche weitere Fragmente. IR (KBr-Preßling): 1275 cm^{-1} (NO). UV (CHCl_3): 365 (ϵ 7580), 383 (11320), 410 (9160), 432 (9730), 272 (110800). NMR: s. Text.

2-Hydroxyphenazin (1) aus 10

Zu einer heißen Lösung von 10 (10 mg) in 10 ml *n*-Butanol wurden 6 mg Na zugesetzt, wobei sich das Gemisch rot färbte. Nach Umsetzung des gesamten Na (ca. 5 min) wurde mit 2 ml kaltem H_2O und anschließend mit 10 ml kalter verd. HCl versetzt, die angesäuerte Phase abgetrennt und mit verd. Kalilauge extrahiert. Der Alkaliextrakt ergab nach Ansäuern mit verd. HCl und Ausschütteln mit CHCl_3 nach HPLC-Reinigung (Lösungsmittel: Hexan/2-Chlorpropan/Dioxan 100:10:10) 1. Mol.-Gewicht (massenspektroskopisch) 196. Das Fragmentierungsmuster entspricht dem von authentischem Material. R_f (DC an Kieselgel 60, $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 5:1) 0,22. (Der R_f -Wert für authentisches 1 ist 0,22, der für 1-Hydroxyphenazin 0,50). HPLC: (Bedingungen wie oben) identische Retentionszeit mit authentischem 1.

2-Hydroxyphenazin-1-carbonsäure (5) aus 10

5 mg **10** in 10 ml Eisessig wurden mit 5 mg $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ sowie katalytischen Mengen AgNO_3 versetzt und 12 h bei 50 °C gerührt, mit ges. NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und mit CHCl_3 extrahiert. Durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ (5:1) und anschließend $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) konnte neben viel **10** als letzte Fraktion **5** rein erhalten werden. Massenspektrum m/e 196 ($\text{M}-\text{CO}_2$). Methylieren [3] mit CH_2N_2 ergab *2-Methoxyphenazin-*

1-carbonsäuremethylester, der bei DC an Kieselgel 60 ($\text{CCl}_4/\text{Ethylacetat}$ 1:2, R_f 0,58 und $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 5:1, R_f 0,60) sowie bei HPLC (Laufmittel Hexan/Isopropanol 100:1) dasselbe Laufverhalten wie authentisches Material zeigte. Auch das UV-Spektrum entsprach dem der authentischen Verbindung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Fonds der Chemie möchten wir für finanzielle Unterstützung bestens danken.

-
- [1] 7. Mitt. der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“; 6. Mitt. s. Ref. [4].
- [2] A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 509; dort auch Angaben über ältere Literatur.
- [3] H. Korth, A. Römer, H. Budzikiewicz und G. Pulverer, *J. Gen. Microbiol.* **104**, 299 (1978).
- [4] Bezgl. des Massenspektrums s.: H. Budzikiewicz, D. Stöckl und A. Römer, *J. Heterocycl. Chem.* **16**, 1307 (1979).
- [5] D. H. Williams und J. Fleming, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart 1971, S. 55.
- [6] a) M. Weigele und W. Leingruber, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 715;
b) H. P. Sigg und A. Todt, *Helv. Chim. Acta* **50**, 716 (1967);
- c) P. Hamm und W. v. Philipsborn, *ibid.* **54**, 2362 (1971);
- d) H. H. Limbach, W. Seiffert, E. Ohmes und H. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **74**, 966 (1970).
- [7] B. Loew und C. R. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 6095 (1965).
- [8] F. A. Daniher, *Org. Prep. Proceed. Int.* **2**, 207 (1970).
- [9] A. G. Cairns-Smith, *J. Chem. Soc.* **1961**, 182.
- [10] E. A. Adelberg, M. Mandel und G. Chien Chin Chen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 788 (1965).
- [11] Bezgl. $[\text{M}-\text{O}]^+$ bei N-Oxiden s. J. H. Bowie, R. G. Cooks, M. C. Janicson und G. E. Lewis, *Austr. J. Chem.* **20**, 2545 (1967) sowie Ref. [6a].