

Bakterieninhaltsstoffe, V¹:
Alkylechinoline und deren N-Oxide aus *Pseudomonas*
aeruginosa

H. Budzikiewicz^{a,*}, U. Schaller^a, H. Korth^b und G. Pulverer^b

^a Institut für Organische Chemie, Universität Köln, D-5000 Köln 41,
Bundesrepublik Deutschland

^b Hygiene-Institut, Universität Köln, D-5000 Köln 41,
Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 15. Januar 1979. Angenommen 10. Februar 1979)

Bacterial Constituents, V: Alkyl Quinolines and Their N-Oxides From
Pseudomonas aeruginosa

Alkyl and alkenyl quinolines (so-called "Pyo-substances") and their N-oxides were isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Structures proposed earlier could be confirmed; a new representative ("Pyo V") is described.

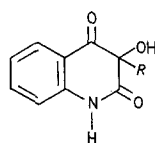
(*Keywords: Alkyl quinolines and N-oxides; Bacterial constituents; Pseudomonas aeruginosa; Pyosubstances*)

Einleitung

Seit etwa 90 Jahren ist bekannt, daß Inhaltsstoffe von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgreich zur Therapie von Milzbrand und einer Reihe anderer Krankheiten eingesetzt werden können². 1945 fanden Hays et al.³, daß es sich bei dem Wirkstoff nicht — wie ursprünglich angenommen — um ein Enzym („Pyocyanase“), sondern vielmehr um ein Gemisch niedrig-molekularer Stickstoffverbindungen handelt, dessen Komponenten („Pyo-Verbindungen“) sie abtrennen und charakterisieren konnten. Wells⁴ schlug 1952 auf Grund UV-spektroskopischer Untersuchungen (vgl.⁵), Ozonolyse sowie einer nicht ganz eindeutigen Synthese (Anilin und 3-Ketocarbonsäureester können zu 2-Alkyl-4- und zu 4-Alkyl-2-chinolonen kondensieren) vor, daß es sich bei Pyo I b, I c und III um 2-Heptyl-, 2-Nonyl- und um 2-(1'-Nonenyl)-chinol-4-on handle. 1956 schließlich gelang es Cornforth und James⁶, 2-n-Alkyl-

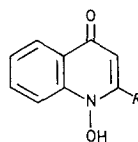
chinol-4-on-*N*-oxide (C_7 , C_9 , C_{11} und etwas C_8) nachzuweisen und eindeutig zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Pyo II-Fraktion. Die *N*-Oxide sind gegen *Bacillus pumilus* antibiotisch wirksam⁷. Zur Biogenese vgl. Ref.⁸.

Da wir aus *Pseudomonas aeruginosa* 3-Alkylchinolin-Derivate (**1**, **2**) isolieren und in ihrer Struktur aufklären konnten⁹, das gleichzeitige Auftreten von 2- und 3-Alkylchinolinen zumindest unerwartet ist und der Strukturbeweis von Wells (s. oben) einige Fragen offen gelassen hat, haben wir die Pyo-Fraktion neu untersucht. Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.



1: $R = n\text{-C}_7\text{H}_{15}$

2: $R = n\text{-C}_9\text{H}_{19}$



3: $R = n\text{-C}_7\text{H}_{15}$

4: $R = n\text{-C}_9\text{H}_{19}$

Ergebnisse und Diskussion

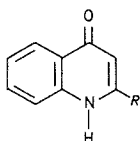
1. Chinolon-*N*-Oxide

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cornforth⁶ konnten nur 2 Homologe (*n*-Heptyl, **3**, und *n*-Nonyl, **4**) im Verhältnis 3:1 nachgewiesen werden ($C_{16}H_{21}NO_2$ und $C_{18}H_{25}NO_2$ durch exakte Massensmessung). Das Massenspektrum des Gemisches zeigt Ionen bei m/e 175 (Basispeak, $M\text{-}C_6H_{12}$ bzw. $M\text{-}C_8H_{16}$ durch *McLafferty*-Umlagerung), m/e 188 (30%, $M\text{-}C_5H_{11}$ bzw. C_7H_{15} , vgl. Ref.¹⁰) und m/e 146 (20%, m/e 175 -CHO). Im IR-Spektrum (KBr) finden sich die N—O-Banden bei 1130 und 1270 cm^{-1} , letztere in für Chinolin-*N*-oxide typischer Weise¹¹ aufgespalten. Eine Bande (s. u.) bei 1644 cm^{-1} spricht dafür, daß in fester Phase die Chinolonform vorliegt (vgl. jedoch zur Frage der Tautomerie die Diskussion in Ref.⁶ und insbes. in Ref.¹¹, S. 404 ff.). Das UV-Spektrum stimmt mit dem von Cornforth⁶ angegebenen überein.

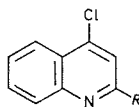
Im NMR-Spektrum (CH_3OH) sind die Alkylsignale (0,98, t; 1,25, 1,72 und 2,85, m) zu tieferem Feld verschoben als bei den 2-Alkyl-4-chinolonen beobachtet, was die Nachbarschaft der Alkylkette zur $N \rightarrow O$ -Gruppierung beweist (vgl. Ref.¹²). Im Aromatenbereich findet sich ein Signal auf Grund der Nachbarschaft zur $N \rightarrow O$ -Gruppe gleichfalls bei tiefem Feld (C-8; 8,3, d). Reduktion mit Zn/HCl ¹³ oder NaBH_4 ¹⁴ liefert ein Gemisch, das sich in 2-*n*-Heptyl- und 2-*n*-Nonylchinol-4-on auftrennen läßt, welche sich als identisch mit den unten beschriebenen Verbindungen **5** und **6** erwiesen (Laufverhalten, UV-, IR-, NMR-, Massenspektren).

2. "Pyo-Verbindungen"

Durch chromatographische Trennung ließen sich 4 Verbindungen im Verhältnis $\sim 1:10:1:1$ rein darstellen, für die massenspektroskopisch die Elementarzusammensetzungen $C_{16}H_{21}NO$, $C_{18}H_{25}NO$,



5-8



9-12

5,9 : $R = n-C_7H_{15}$

6,10 : $R = n-C_9H_{19}$

7,11 : $R = n-CH=CH-C_7H_{15}$

8,12 : $R = n-(CH_2)_2-CH=CH-C_7H_{15}$

$C_{18}H_{23}NO$ und $C_{20}H_{27}NO$ (entspr. Heptyl-, Nonyl-, Nonenyl- und Undecenylchinolon) bestimmt werden konnten (5-8). Die Verbindungen 5, 6 und 8 zeigen das für 2-Alkyl-chinolinsysteme typische Fragmentierungsmuster¹⁵ (*McLafferty*-Umlagerung zu m/e 159 — dieses Ion verliert weiter $\cdot CHO$, m/e 130 — und insbesondere β -Spaltung der Alkylkette, m/e 172, die bei Alkylierung an C-3 oder C-4 nicht hervortritt); 5 führt zusätzlich zu einem intensiven Ion bei m/e 198.

Die UV-Spektren von 5, 6 und 8 zeigen identische Absorptionsmaxima, während die von 7 zu längeren Wellenlängen verschoben sind; die von uns beobachteten Werte für 5, 6 und 7 stimmen mit den Angaben⁴ für Pyo Ib, Ic und III überein. Die Unterschiede im Fragmentierungsverhalten und in den UV-Spektren von 7 und 8 legen nahe, daß bei 7, nicht aber bei 8, die Seitenketten-Doppelbindung mit dem Kern konjugiert ist.

Mit der 4-Chinolonstruktur im Einklang¹⁶ ist die Lage der CO-Bande (1639 cm^{-1} ; bei den isomeren 4-Alkyl-2-chinolonon werden höhere Wellenzahlen beobachtet) im IR-Spektrum des Gemisches von 5-8 sowie die NMR-Spektren (CCl_4) von 5 + 6 bzw. 7 + 8, die sich nur durch das Signal der olefinischen Protonen unterscheiden. Durch die C=O-Gruppe (C-4) wird ein aromatisches Proton (H-5) entschirmt (δ 8,4 ppm, d), während H-3 aus sterischen Gründen nicht beeinflusst wird (δ = 6,25 ppm, s)^{17, 18}. H-8 findet sich bei δ = 7,90 (d), H-6 und H-7 erscheinen als t bei δ 7,35 und 7,65 ppm. Die Alkylsignale treten bei 0,8 (t), 1,2 (m), 1,77 (m) und 2,77 (m), die der olefinischen Protonen bei 5,2 ppm auf (das schlecht aufgelöste Signal läßt eine Entscheidung zwischen *Z*- und *E*-Konfiguration nicht zu).

Ozonolyse sowohl von **7** als auch von **8** ergab Octanal, das als 2,4-Dinitrophenylhydrazon durch Vergleich mit authentischem Material (Fp., Massenspektrum, Laufverhalten) identifiziert werden konnte. Daraus folgt, daß (vgl. oben die Spektrendiskussion) bei **7** die Doppelbindung zwischen C-1' und C-2', bei **8** zwischen C-3' und C-4' liegen muß.

Das Gemisch von **5**—**8** ließ sich durch Erhitzen¹⁹ mit POCl₃ in die entsprechenden 4-Chlor-chinoline (**9**—**12**) überführen [M^+ (³⁵Cl) m/e 261, 287, 289 und 315, Hauptfragmente m/e 177 und 190 durch *McLafferty*-Umlagerung bzw. β -Spaltung, vgl. oben; NMR (CF₃COOD): H-3 wegen der Nachbarschaft zum Cl 8,05 ppm, s, Aromatenprotonen zwischen 8,3 und 8,65 ppm]. Umsetzung von reinem **5** führte entsprechend zu **7**, das sich als mit synthetischem 4-Chlor-2-*n*-heptylchinolin (aus 4-Chlorchinolin-*N*-oxid und *n*-Heptylmagnesiumbromid in THF²⁰) identisch (Fp., NMR, Massenspektrum) erwies.

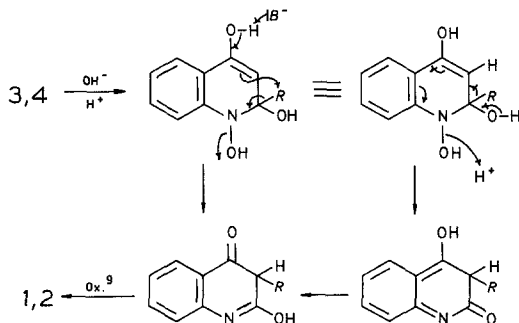
3. Einfluß von Eisen im Kulturmedium

Die Bildung sowohl der „Pyo-Verbindungen“ als auch der *N*-Oxide wird bei Zusatz von Eisen zum Nährmedium (s. Exper. Teil) verringert, und zwar gegenüber Kulturen ohne Eisenzusatz auf etwa ein Zehntel (vgl. Ref. 21).

Zusammenfassung

Die Pyo-Verbindungen I b, I c und III sowie die *Cornforth*schen *N*-Oxide von I b und I c konnten in ihrer Struktur als **5**, **6**, **7**, **3** und **4** gesichert sowie **8** als neuer Typ (der Nomenklatur folgend als „Pyo V“ zu bezeichnen) aufgeklärt werden. Bemerkenswert ist, daß **3** und **4** im selben Mengenverhältnis gebildet werden wie **1** und **2**, so daß deren Entstehung aus **3** und **4** möglich erscheint. Bildung von 3-Methylchinolon-2 aus 2-Methylchinolin-*N*-oxid ist auf photochemischem Weg²³, unseres Wissens bisher aber nicht unter Säure- oder Baseneinwirkung beobachtet worden.

Die Umlagerung ließe sich durch Basenangriff am enolischen Hy-



droxyl erklären. Da jedoch Alkylwanderungen zu einem Enolat-Anion ungewöhnlich sind und überdies Basenangriff bei 2-Alkylpyridinsystemen in der Regel an der α -ständigen CH_2 -Gruppe erfolgt, sollte auch Abspaltung des Hydroxylamin-OH mit nachfolgender Alkylwanderung (vergleichbar einer vinylogenen *Beckmann*-Umlagerung) in Betracht gezogen werden. Entsprechende Untersuchungen sind im Gange.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatographie (analytisch): DC-Alufolien belegt mit Kieselgel F₂₅₄ mit Fluoreszenzindikator (Merck).

Säulenchromatographie (präparativ): Kieselgel 60 (0,04–0,06 mm) (Merck).

Hochdruckflüssigchromatographie: HPLC-Gerät Fr-30 (Knauer), LiChrosorb RP-8 Säule (10 μm) (Merck).

Massenspektrometer: Finnigan 3200, Varian CH7A, Varian MAT 731 (exakte Massenmessungen).

UV-Spektren: Beckmann 25. Angaben λ (log ϵ) nm.

IR-Spektren: Perkin-Elmer 243.

NMR-Spektren: Varian EM-390, Bruker WP-60 (s-Singulett, d-Dublett, t-Triplett, m-Multiplett).

Rohmaterial: 4,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 15,0 g Na-gluconat, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 g Fe-Citrat wurden mit H_2O auf 1 l gebracht (*pH* auf 7,4 eingestellt), mit Stamm 5293 von *Pseudomonas aeruginosa* beimpft, die Kulturen eine Woche bei 29–30 °C bebrütet, zentrifugiert und die Rückstände mit Ethylacetat extrahiert. Nach weitgehendem Entfernen des Lösungsmittels wurde der ölige Extrakt (etwa 700 mg) an Kieselgel ($\text{CCl}_4/\text{Aceton}$ 3:2) in 4 Fraktionen (gelbgrün, hellblau, blau und nicht fluoreszierend) aufgetrennt.

Die 1. Fraktion enthält Zersetzungsprodukte, da sie sich aus den reinen Folgefraktionen stets nach einiger Zeit nachbildet; sie wurde nicht näher untersucht.

Aus der 2. Fraktion des Rohextraktes kristallisierte nach Zusatz von Aceton im Kühlschrank das Gemisch von **3** und **4** aus. Weitere Substanz konnte durch Chromatographie der Mutterlaugen an Kieselgel ($\text{Aceton}/\text{CHCl}_3$ 7:3) gewonnen werden. Ausbeute (nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton) etwa 30 mg.

Die 3. Fraktion wurde wie oben angegeben rechromatographiert. Umkristallisieren des dabei anfallenden kristallinen Materials aus Aceton und danach aus Dioxan ergab 50 mg eines Gemisches von **5**–**8**. Erneute Chromatographie wie oben brachte Trennung in **5** + **6** und **7** + **8**, vollständige Trennung des Gemisches gelang mit Hilfe von HPLC (Säulentemp. 56°, 150 bar, 3 ml/min, Laufmittel $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 6:4). Da das so abgetrennte **7** noch mit etwas **6** verunreinigt war, wurde nochmals an mit 20% AgNO_3 imprägniertem Kieselgel mit CHCl_3 chromatographiert.

Die 4. Fraktion enthält unpolare Substanzen, die nicht weiter untersucht wurden.

2-n-Heptylchinol-4-on (5). Fp. 147°; UV (CH_3OH): 213 (4,41), 236 (4,46), 316 (4,05), 327 (4,04); Mol.-Gew. (massensp.) 243.

2-n-Nonylchinol-4-on (6). Fp. 137°; UV (CH_3OH): 213 (4,37), 236 (4,43), 316 (4,02), 327 (4,00); Mol.-Gew. (massensp.) 271.

2-*n*-(1'-nonenyl)chinol-4-on (7). Fp. 150°; UV (CH₃OH): 258 (4,59), 267 (4,58), 308 (3,94), 330 (4,05); Mol.-Gew. (massensp.) 269.

2-*n*-(3'-undecenyl)chinol-4-on (8). Fp. 114°; UV (CH₃OH): 213 (4,58), 236 (4,58), 316 (4,09), 327 (4,11); Mol.-Gew. (massensp.) 297.

Gemisch von 2-*n*-Heptyl- und 2-*n*-Nonylchinol-4-on-*N*-oxid (3 + 4). Fp. 148—149°. UV (CH₃OH): 248 (4,30), 342 (3,82), 350 (3,79). Mol.-Gew. (massensp.) 259 und 287.

Reduktion von 3 + 4 zu 5 + 6. a) 32 mg 3 + 4 wurden in überschüssiger Salzsäure gelöst und mit 250 mg Zn-Staub in kleinen Portionen versetzt. Nach Zugabe von Na₂CO₃ bis zur alkalischen Reaktion wurde 10 min unter Rückfluß erhitzt, heiß filtriert, mit CHCl₃ extrahiert und aus Aceton umkristallisiert. Ausb. 17 mg (56%) 5 + 6. b) Eine Lösung von 24 mg 3 + 4 in THF wurde zu 9 mg NaBH₄ in THF zugesetzt, zum Sieden erhitzt, anschließend 5 h bei Raumtemp. belassen, mit Essigsäure angesäuert, eingengt und mit CHCl₃ extrahiert. Ausb. (nach Umkristallisieren aus Aceton) 16 mg (70%). Trennung von 5 + 6 erfolgte wie oben.

Ozonolyse von 7 bzw. 8. In eine Lösung von 50 mg Substanz in 40 ml CHCl₃ wurde unter Kühlung (CH₃OH/Trockeneis) 50 min O₃ (0,2 g/h), danach bei Raumtemp. 5 min O₂ eingeleitet, dann unter kräftigem Rühren 1,3 ml Eisessig und 50 mg Mg-Späne zugesetzt und anschließend im Vak. eingengt, in C₂H₅OH aufgenommen und mit einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (0,4 g in 2 ml H₂SO₄, 2 ml H₂O, 5 ml C₂H₅OH) versetzt. Fp. (nach Umkrist. aus Dioxan/H₂O) und Mischschmp. mit authentischem Material 104°C. *R_f* 0,52 (C₆H₆/Petrolether 35—60°C 6:4), 0,35 (CHCl₃/Petrolether 35—60°C (75:25), 0,34 (C₆H₆/*n*-Hexan 1:1), 0,90 (CCl₄/Aceton 3:2). Mol.-Gew. (massensp.) 308.

Überführung des Gemisches 5—8 in 9—12. 60 mg Substanz wurden unter Eiskühlung mit 0,3 ml POCl₃ versetzt, anschließend 30 min auf 140° erhitzt, auf 60°C abgekühlt und in ein Gemisch von 8 g Eis, 1,96 g NaOH und 1,9 ml H₂O gegossen, abfiltriert und mit viel H₂O gewaschen. Ausb. 58,4 mg (90%). Überführung von reinem 5 in 9 erfolgte analog. Fp. 65°, Mol.-Gew. (massensp.) 261.

4-Chlorchinolin-*N*-oxid. 4,26 g 4-Chlorchinolin (EGA) in 7,3 ml Eisessig wurden mit 2,4 ml H₂O₂ (30%) versetzt, 3 h auf 76° erhitzt, abgekühlt, nochmals mit 4 ml H₂O₂ versetzt und bei Raumtemp. gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachzuweisen war. Die Lösung wurde hierauf mit heißer gesättigter Na₂CO₃-Lösung alkalisch gemacht, mit H₂O verdünnt, filtriert und mit 600 ml CHCl₃ extrahiert. Über Aufarbeitung ergab 3,69 g (79%) 4-Chlorchinolon-*N*-oxid. Fp. 132°C (Lit.²² 133°C). Mol.-Gew. (massensp., ³⁵Cl) 179.

4-Chlor-2-*n*-heptylchinolin (9). Eine Lösung von *n*-Heptylmagnesiumbromid (0,01 mol) in 20 ml THF ließ man unter Kühlen langsam zu einer Lösung von 0,9 g 4-Chlorchinolin-*N*-Oxid in 20 ml THF tropfen, rührte 5 h bei Raumtemp., trennte nach Zugabe von wenig H₂O die organische Phase ab und extrahierte den Rückstand mit 600 ml CHCl₃. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden durch Chromatographie an Kieselgel mit Aceton/CCl₄ 2:3 18 mg (1,3%) 9 erhalten. Fp. 65°C. Mol.-Gew. (massensp.) 261.

Literatur

- IV. Mitt.: A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, Tetrahedron Letters **1979**, 509.
- Literaturangaben über frühere Arbeiten finden sich in Ref.³.

- ³ E. E. Hays, I. C. Wells, P. A. Katzman, C. K. Cain, F. A. Jacobs, S. A. Thayer, E. A. Doisy, W. L. Gaby, E. C. Roberts, R. D. Muir, C. G. Carroll, L. R. Jones und N. J. Wade, J. Biol. Chem. **159**, 725 (1945).
- ⁴ I. C. Wells, J. Biol. Chem. **196**, 331 (1952).
- ⁵ G. W. Ewing und E. A. Steck, J. Amer. Chem. Soc. **68**, 2181 (1946); E. A. Steck, G. W. Ewing und F. C. Nachod, J. Biol. Chem. **71**, 238 (1949).
- ⁶ J. W. Cornforth und A. T. James, Biochem. J. **63**, 124 (1956).
- ⁷ J. W. Lightbown, J. Gen. Microbiol. **11**, 477 (1954).
- ⁸ M. Luckner und C. Ritter, Tetrahedron Lett. **1965**, 741.
- ⁹ W. Neuenhaus, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, Z. Naturforsch. **34 b**, 313 (1979).
- ¹⁰ D. A. Lightner, R. Nicoletti, G. B. Quistad und E. Irwin, Org. Mass. Spectrom. **4**, 571 (1970).
- ¹¹ E. Ochiai, Aromatic Amine Oxides. Amsterdam: Elsevier. 1967.
- ¹² E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1976.
- ¹³ K. L. McCluskey, J. Amer. Chem. Soc. **44**, 1573 (1922).
- ¹⁴ Y. Kawazoe und M. Tachibana, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **13**, 1103 (1965).
- ¹⁵ S. Sample, D. A. Lightner, O. Buchardt und C. Djerassi, J. Org. Chem. **32**, 997 (1967); P. M. Draper und D. B. MacLean, Canad. J. Chem. **46**, 1487 (1968); vgl. auch H. Budzikiewicz und U. Besler, Org. Mass. Spectrom. **11**, 398 (1976).
- ¹⁶ J. R. Price und J. B. Willis, Austral. J. Chem. **12**, 589 (1959).
- ¹⁷ Bzgl. dieser Zuordnung vgl. R. Tschesche und W. Werner, Tetrahedron **23**, 1873 (1967) sowie A. M. Duffield und P. R. Jefferies, Austral. J. Chem. **16**, 292 (1963).
- ¹⁸ Beim isomeren 3-substituierten 4-Chinolon wäre H-2 wegen der Nachbarschaft zum N bei tieferem Feld (unter $\delta = 8,0$ ppm) zu erwarten (vgl. Ref.¹²).
- ¹⁹ G. Jones (Hrsg.), The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Bd. 32, Quinolines, Teil I. London: Wiley. 1977; A. M. Spivey und F. H. S. Curd, J. Chem. Soc. **1949**, 2656.
- ²⁰ T. Kato und H. Yamanaka, J. Org. Chem. **30**, 910 (1965).
- ²¹ F. Wensinck, A. van Dalen und M. Wedema, A. v. Leeuwenhoek **33**, 73 (1967).
- ²² E. Ochiai, J. Org. Chem. **18**, 534 (1953).
- ²³ O. Buchardt, J. Becher, C. Lohse und J. Möller, Acta Chem. Scand. **20**, 262 (1966); und dort angegebene Literatur.