

Hans-Joachim Knackmuss

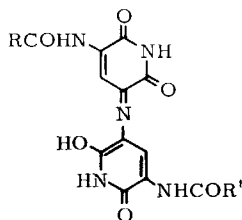
Struktur und Synthese des Pigmentes von *Pseudomonas lemonnieri*

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

(Eingegangen am 18. Februar 1967)

Die spektroskopischen Eigenschaften des Bakterienpigmentes von *Pseudomonas lemonnieri* werden mit denen vom Bakterienfarbstoff Indigoidin (4) und seinen Derivaten verglichen. Der Mechanismus der Umwandlung des *Pseudomonas*-Pigmentes in das *N,N'*-Dioctanoyl-indigoidin 6 wird aufgeklärt. Für das Pigment wird die „Diaza-indophenol“-Struktur 1 durch Synthese von Modellfarbstoffen und des Naturstoffes selbst bewiesen.

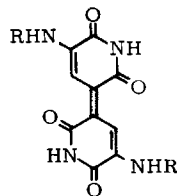
Die Strukturaufklärung des extrazellulären Bakterienfarbstoffes Indigoidin (4)¹⁾ lenkte unsere Aufmerksamkeit auch auf das tiefblaue intrazelluläre Bakterienpigment von *Pseudomonas lemonnieri*. Im Gegensatz zu 4 zeigt das Pigment von *Ps. lemonnieri* negative Solvatochromie (z. B. λ_{\max} in Chloroform, Aceton, Äthanol: 638, 625, 621 m μ). Für die Farbe des Bakteriums ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt²⁾, das Anion des „Diaza-indophenols“ 1 (λ_{\max} 623 m μ in DMSO) verantwortlich. Ersetzt man die endocyclischen Gruppen $-\text{NH}-\text{CO}-$ durch $-\text{CH}=\text{CH}-$, so erhält man



1: R = R' = $-\text{[CH}_2\text{]}_6\text{-CH}_3$

2: R = R' = CH_3

3: R = $-\text{[CH}_2\text{]}_6\text{-CH}_3$; R' = CH_3



4: R = H

5: R = COCH_3

6: R = $\text{CO-[CH}_2\text{]}_6\text{-CH}_3$

den Chromophor eines Indophenol-Anions. Der neuartige Naturfarbstoff 1 ist dem Anion der Purpursäure verwandt; dort sind vier $-\text{CH}=\text{CH}-$ Gruppen des Indophenol-Anions durch $-\text{CO}-\text{NH}-$ ausgetauscht. Die freie Säure 1 (bzw. Tautomere) zeigt eine um 4 m μ längerwellige (s. Tab.), schärfere Bande mit höherer Extinktion als das Anion.

¹⁾ R. Kuhn, M. P. Starr, D. A. Kuhn, H. Bauer und H.-J. Knackmuss, Arch. Mikrobiol. 51, 71 (1965); R. Kuhn, H. Bauer und H.-J. Knackmuss, Chem. Ber. 98, 2139 (1965).

²⁾ Siehe auch M. P. Starr und H.-J. Knackmuss, Arch. Mikrobiol., im Druck.

Spektraldaten einiger dargestellter Verbindungen und Vergleichs-substanzen

Verbindung	Absorptions- maxima λ_{\max} log ϵ (mitl.)	IR-Absorptionen in KBr		vC=O (cm ⁻¹) Amid I; Amid II; andere	Vinyl	NMR-Signale -Werte bei 20° in DMSO-d ₆ OH bzw. NH	
		ν_{NH} bzw. OH frei ass.	$\nu_{\text{C=O}}$ bzw. OH frei ass.			OH bzw. NH aliphatisch, Protonen	f. H ₃ C—[CH ₂] _n —
6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1,4)-4-[5-octanoylamino-2,6-dihydroxy-pyridyl-(3)-imid] (1)	627 4.96 (DMSO)	3380	2700—3300	1635 1675	1.13	0.48 exocycl. endocycl.	8.9 (Multipl. *) f. H ₃ C—[CH ₂] ₆ —
6-Acetamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1,4)-4-[5-acetamino-2,6-dihydroxy-pyridyl-(3)-imid] (2)	628 4.71 (DMSO)	3280 3310	2700—3300	1650 (breit)	1.31	0.29 exocycl. endocycl.	7.81 (CH ₃)
5,5'-Bis-octanoylamino-4,4'-dihydroxy-3,3'-diaz-diphenochinon-(2,2') (6)	515 4.43 (DMSO)	3370	2700—3350	1665 (breit)	0.19	0.42 exocycl. endocycl.	8.7 (Multipl.)
6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1,4) (II)	345 3.57 (CH ₃ OH)	3300 3260	2700—3400	1665 1690	2.43	0.05 —2.32	8.72 (Multipl.)
Phenylhydrazon von II	438 4.54 (CH ₃ OH)			1665 (breit)	1.85	0.73 exocycl. —3.85	8.72 (Multipl.)
5-Benzolazo-3-acetamino-2,6-dihydroxy-pyridin (12a)	438 4.50 (CH ₃ OH)		2700—3450	1660 (breit)	1.88	0.62 exocycl. —3.84	7.87 (CH ₃)
5-Benzolazo-3-octanoylamino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure (13b)	424 4.55 (CH ₃ OH)	3310	2800—3330	1640 1655 1670 1690			
5-Benzolazo-3-acetamino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure (13a)	423 4.55 (CH ₃ OH)	3290	2800—3320	1655 1680		0.74 —1.95 —3.97	8.06 (CH ₃)
3,5-Bis-diacetylaminooctanoyl-pyridin	273 3.82 (CH ₃ OH)			1715 1760 1780	2.40		7.70 (4CH ₃) ** 7.63 (2CH ₃)
Acetyl-bis-[5-diacetylaminooctanoyl-pyridyl-(3)]-amin	282 4.06 (CH ₃ OH)			1720 1770 (breit)	2.30		7.80 (CH ₃) ** 7.67 (4CH ₃) 7.65 (4CH ₃)

*) Gemessen bei 80°; Signal-Rauschverhältnis bei 100 Durchgängen mittels Time Average Computer, Varian C 1024, verbessert.

**) Gemessen in DCI₃.

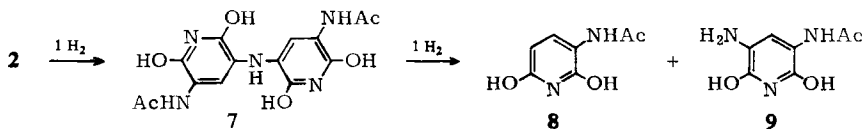
Ein Vergleich des IR-Spektrums des Pigmentes **1** von *Ps. lemonnieri* mit dem Spektrum des *N,N'*-Diacetyl-indigoidins **5** (5.5'-Diacetamino-4.4'-dihydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2'))¹⁾ deutet wegen ähnlicher NH- bzw. OH-Assoziationsschwingungen (2700–3400/cm) und Amid I- sowie Amid II-Banden auf gleichartige funktionelle Gruppen hin. Auch findet man Übereinstimmung mit dem Spektrum des *N,N'*-Dioctanoyl-indigoidins **6**²⁾ in der kürzestwelligen, nicht assoziierten NH-Absorption (s. Tab.) und in den ν CH-Schwingungen des Heptylrestes. Im Fingerprint-Gebiet findet man in beiden Spektren gleichviel mittelstarke Banden und zwischen 400 und 550/cm zwei starke Banden.

Für den Bakterienfarbstoff **1** und *N,N'*-Dioctanoyl-indigoidin **6** erhält man gleichartige NMR-Spektren (s. Tab.). Der Übergang zwischen den Tautomeren von **1** scheint so rasch zu erfolgen, daß ein Signal für das acide Proton und eine asymmetriebedingte Aufspaltung der Vinyl- und NH-Protonen nicht beobachtet wird.

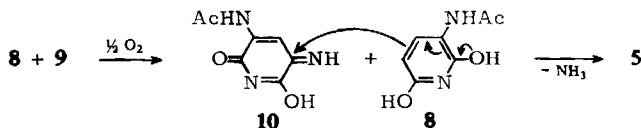
Die beiden Farbstoffe zeigen ähnliche Löslichkeiten und entsprechende chromatographische Eigenschaften.

Bei der katalytischen Hydrierung mit Pd nimmt das Pigment leicht zwei Äquivalente H_2 auf. Bei der Autoxydation der Hydrierungsprodukte entsteht **6** in über 60-proz. Ausbeute (vgl. I. c.²⁾).

Völlig gleichartig reagiert der homologe Modellfarbstoff **2** zum *N,N'*-Diacetyl-indigoidin **5**. Unter Reinstickstoffatmosphäre lassen sich Derivate der durch Hydrogenolyse der Stickstoffbrücke entstandenen Produkte **8** und **9** gewinnen. 3-Acetamino-2.6-dihydroxy-pyridin (**8**) läßt sich durch Umsetzung mit Benzoldiazoniumchlorid als



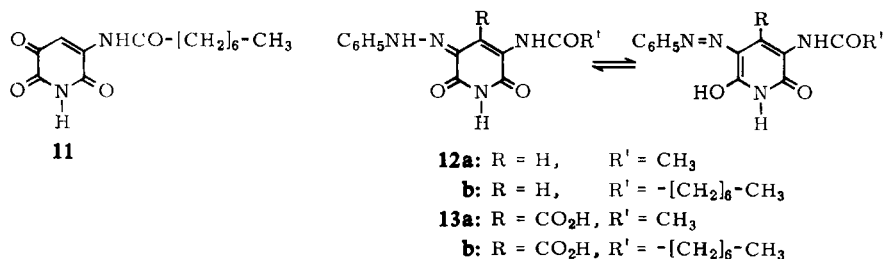
5-Benzolazo-3-acetamino-2.6-dihydroxy-pyridin (**12a**) abfangen. Durch Acetylierung wurde das sehr autoxydable **9** stabilisiert als 3.5-Bis-diacetylamino-2.6-diacetoxypyridin, welches indentisch mit dem Produkt ist, das man durch hydrierende Acetylierung des Azofarbstoffes **12a** erhält. Bei Einwirkung von Luftsauerstoff auf das Gemisch der Hydrierungsprodukte (**8** + **9**) entsteht *N,N'*-Diacetyl-indigoidin **5** durch C—C-Verknüpfung der Ringe und NH_3 -Eliminierung:



Hydriert man **2** mit Raney-Nickel, so wird ein Äquivalent H_2 rasch aufgenommen (Bildung der Leukoform **7**). In verd. Natronlauge als Lösungsmittel erhält man bei der Reoxydation mit Luft ein Natriumsalz des Farbstoffes **2**. Man gewinnt das Heptaacetylderivat der Leukoform **7**, Acetyl-bis-[5-diacetylamino-2.6-diacetoxypyridyl-(3)]-amin, wenn man in Acetanhydrid bei 50° hydriert.

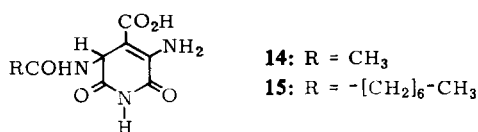
Synthese von Modellverbindungen

Wie schon berichtet²⁾, wird das Pigment **1** von *Ps. lemonnieri* durch konz. Salpetersäure zu 6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1.4) (**11**) abgebaut. Die Struktur des Phenylhydrazons vom Heterocyclus **11** wurde durch Synthese des homologen Acetylmodelles **12a** bewiesen: Die Acetylierung von Amino-citrazinsäure (3-Amino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure)³⁾ ergibt eine Diacetyl-aminocitrazinsäure, welche einen *O*-gebundenen Acetylrest durch Hydrolyse leicht verliert. Die gebildete



Acetamino-citrazinsäure reagiert mit Benzoldiazoniumchlorid zur Azofarbstoffcarbon-säure **13a**. Diese geht durch Sublimation bei 200° unter Decarboxylierung in das homologe Phenylhydrazon **12a** über, das in seinen spektroskopischen Eigenschaften (s. Tab.) mit dem Phenylhydrazon von **11** gut übereinstimmt.

Bei der katalytischen Hydrierung von **13a** entsteht die Amino-acetamino-citrazinsäure (**14**), die besonders in Lösung sehr autoxydabel ist. Es gelang nicht, **14** in reiner Form abzuscheiden. Hydriert man jedoch in Eisessig, worin Ausgangs- und Endprodukt wenig löslich sind, gelingt die Isolierung eines katalysatorhaltigen kristallinen Produktes in guter Ausbeute. Auf Grund des NMR-Spektrums von **14** (in DMSO-d₆ Dubletts bei τ 5.35 und 1.38 für das Allyl-Proton und exocycl. NH, $J = 8$ Hz, breites Signal bei τ 2.90 für NH₂, $\tau = -1.52$ und -2.20 für NH bzw. OH und CO₂H) muß für die Aminocarbonsäure die Struktur **14** formuliert werden.

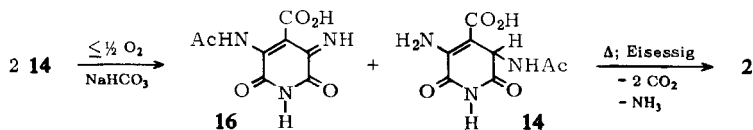


Acylierungs- und Kondensationsversuche an der Aminogruppe von **14** erbrachten keine einfachen Derivate. Jeweils trat gleichzeitig Reaktion mit der Carboxylgruppe ein (Kondensation oder Decarboxylierung).

Bei der Autoxydation von **14** in heißem Eisessig entsteht langsam das „Diazindophenol“ **2**. Sehr schnell verläuft die Autoxydation in alkalischer Lösung, jedoch ohne Farbstoffbildung. Man erhält blaßgelbe Lösungen, aus denen man das Azachinonimid **16** bzw. dessen Hydrolyse- und Decarboxylierungsprodukt mit Phenylhydrazin als 5-Benzolazo-3-acetamino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure (**13a**) und 5-Benzolazo-3-acetamino-2,6-dihydroxy-pyridin (**12a**) ausfällen kann. Verhindert man, daß sich

³⁾ Z. B. Papanastassiou, A. Mc Millan, V. J. Czebotar und T. J. Bardos, J. Amer. chem. Soc. **81**, 6056 (1959).

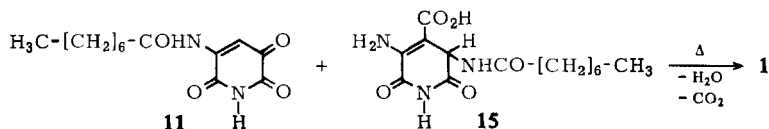
in alkalischer Lösung mehr als 50% der Aminocarbonsäure **14** autoxydieren, so tritt bei Zugabe von Eisessig sofort Kondensation von **16** mit unverändertem **14** ein. Beim Decarboxylieren erhält man den Farbstoff **2** in großen metallischgrünen Kristallen.



Im Gegensatz zum Bakterienpigment wurde im Massenspektrum von **2** ein Molekularpeak gefunden.

Strukturbeweis durch Synthese des Pigmentes 1

Analog der Darstellung von **14** gewinnt man die homologe Octanoylverbindung **15** durch Hydrierung des entsprechenden Azofarbstoffes **13b**, dessen Decarboxylierungsprodukt mit dem Phenylhydrazon von **11** identisch ist. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit von **15** kann man in verd. Natronlauge hydrieren und das Hydrierungsprodukt **15** mit verd. Salzsäure ausfällen. Bei der Autoxydation von **15** in heißem Eisessig entsteht erwartungsgemäß der Bakterienfarbstoff **1** (vgl. Bildung von **2**). Man gewinnt **1** in leicht überschaubarer Weise durch Kondensation von **15** mit dem durch Pigmentabbau gewonnenen 6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1.4) (**11**)²⁾ in 80-proz. Ausbeute.



Verwendet man anstelle von **15** die homologe Aminocarbonsäure **14**, so erhält man den Modellfarbstoff **3**, der einen Acetyl- und einen Octanoylrest trägt. Das Produkt enthält wegen Autoxydation von **14** den Modellfarbstoff **2**, wie man dünnschichtchromatographisch und am NMR-Spektrum erkennt (das Signal bei τ 0.38 für NH der Octanoylamino-Gruppe ist schwächer als das entsprechende bei τ 0.29 der Acetaminogruppe).

Besonderen Dank sage ich Herrn Prof. Dr. R. Kuhn für wertvolle Diskussionen zu dieser Arbeit. Ich danke Herrn Prof. Dr. M. P. Starr für die Überlassung von natürlichem Pigment. Herrn Dr. W. Otting danke ich für IR-spektroskopische Messungen, Herrn Dr. J. Jochims und Fräulein G. Taigel für die Aufnahme und Diskussion der NMR-Spektren, Herrn Dr. Ch. Wünsche (Chemisches Institut der Universität Heidelberg) für massenspektrometrische Messungen und Herrn J. Briaire für technische Hilfe.

Beschreibung der Versuche

Diacetyl-aminocitrazinsäure: 10 g *3-Amino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure* (*Amino-citrazinsäure*) werden mit 200 ccm *Acetanhydrid* und 10 Tropfen 70-proz. *Perchlorsäure* 60 Min. bei 100–110° acetyliert. Man entfernt das *Acetanhydrid* weitgehend i. Vak. und zerstört den Rest mit *Methanol*. Beim Einengen scheidet sich das *Diacetyl-Derivat* kristallin ab. Man wäscht mit wenig kaltem *Methanol*. Ausb. 12 g (90%). Aus *Methanol* Zers. ab 150°. UV (*Methanol*): λ_{\max} 317 m μ (log ϵ 3.73).

$C_{10}H_{10}N_2O_6$ (254.2) Ber. C 47.25 H 3.97 N 11.02 2 CH₃CO 33.86
Gef. C 47.49 H 4.36 N 11.07 CH₃CO 33.64

3-Acetamino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure (*Acetamino-citrazinsäure*): 700 mg des rohen *Diacetyl-Derivates* werden in 10 ccm *Wasser* unter Umrühren 10 Min. auf dem Dampfbad erhitzt. Aus der blaßgelben Lösung scheiden sich im Eisbad 420 mg (72%) *Monohydrat* in derben strohgelben Kristallen ab. Nach 20 Stdn. Trocknen bei 90° i. Hochvak. Zers. ab 150°. UV (*Methanol*): λ_{\max} 342–347 m μ (log ϵ 3.76).

$C_8H_8N_2O_5$ (212.2) Ber. C 45.29 H 3.80 N 13.21 1 CH₃CO 20.29
Gef. C 45.12 H 3.83 N 13.07 CH₃CO 20.56

5-Benzolazo-3-acetamino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure (*Benzolazo-acetamino-citrazinsäure*) (**13a**): 6.0 g der rohen *Diacetyl-aminocitrazinsäure* werden in 600 ccm *Wasser* 40 Min. auf dem Dampfbad hydrolysiert. Die auf 10° abgekühlte Flüssigkeit oder eine entsprechende Lösung von *3-Acetamino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure* wird mit einer Lösung von 3.8 g *Benzoldiazoniumchlorid* versetzt, wobei sich sofort der gelbe Azofarbstoff **13a** kristallin abscheidet. Er wurde mehrmals aus NaHCO₃-Lösung umgefällt und zur Analyse bei 60°/15 Torr 24 Stdn. getrocknet. Ausb. 6.7 g (90%), *Decarboxylierung* ab 140°, Zers. ab 300°.

$C_{14}H_{12}N_4O_5$ (316.3) Ber. C 53.16 H 3.82 N 17.72 Gef. C 52.97 H 4.14 N 18.05

Bei schärferem Trocknen verliert die Substanz langsam CO₂.

Methylierung von 13a: 632 mg **13a** werden in THF mit einem großen Überschuß *Diazomethan* umgesetzt. Aus *Methanol* 260 mg feine orangefarbene Nadeln, Schmp. 224°.

$C_{16}H_{16}N_4O_5$ (344.3) Ber. C 55.81 H 4.68 N 16.27 1 OCH₃ 9.01 1 N-CH₃ 4.37
Gef. C 55.96 H 4.80 N 16.58 OCH₃ 9.07 N-CH₃ 3.12

5-Benzolazo-3-acetamino-2.6-dihydroxy-pyridin (**12a**): 150 mg **13a** werden mit ca. 400 mg *Kupferbronze* innig verrieben und in einer Sublimationsbirne bei 0.5 Torr auf 220–240° erhitzt. Das ziegelrote Sublimat ist nach dem Dünnschichtchromatogramm (*Kieselgel G*, *Benzol/Dioxan/Eisessig* 90 : 25 : 4) nicht einheitlich. Hauptprodukt (gelber Fleck, *R_F* 0.72) ist **12a**. Ausgangsmaterial (gelber, sehr langsam wandernder Fleck) entfernt man durch Extraktion mit NaHCO₃-Lösung. Vom Nebenprodukt (orangeroter Fleck, *R_F* 0.58, λ_{\max} 435 m μ) wird abgetrennt, indem man das Sublimat mit wenig siedendem Eisessig extrahiert. Aus der Eisessiglösung scheidet sich nach Zugabe von Wasser (1/5 des Volumens) beim Erkalten **12a** (30–40 mg) in gelbbraunen Nadeln ab, Zers. ab 320°.

$C_{13}H_{12}N_4O_3$ (272.3) Ber. C 57.35 H 4.44 N 20.58 1 CH₃CO 15.81
Gef. C 57.30 H 4.48 N 20.42 CH₃CO 15.19

3-Amino-5-acetamino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure (*Amino-acetamino-citrazinsäure*) (**14**): Eine Suspension von 3.5 g **13a** in 45 ccm Eisessig wird mittels vorhydriertem Pd/BaSO₄-Katalysator (5-proz.) hydriert. Das in farblosen Kristallen ausfallende Reaktionsprodukt vermindert die Aktivität des Katalysators. Nach 12–15 Stdn. ist das Reaktionsgemisch farblos ge-

worden. Unter O₂-Ausschluß wird **14** zusammen mit Katalysator abgesaugt, mit Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet. Ausb. abzüglich Katalysator 1.7 g (68%). Zur Analyse wurde eine kleine Menge durch rasches Lösen in heißem Wasser, Abtrennen des Katalysators und Kühlen im Eisbad umkristallisiert. Feine, schwach bläuliche Kristalle, ab 200° rasche Zers. UV (Methanol): λ_{\max} 328 m μ (log ϵ 3.82).

C₈H₉N₃O₅ (227.2) Ber. C 42.29 H 3.99 N 18.50 1 CH₃CO 18.95
Gef. C 42.03 H 3.99 N 18.29 CH₃CO 19.41

Zur Darstellung größerer Mengen katalysatorfreiem **14** löst man das Rohprodukt in wenig methanolischer Salzsäure und fällt nach Filtration durch eine G4-Fritte das *Hydrochlorid von 14* durch Zugabe von Äther. Grobe, fast farblose Kristalle, die an feuchter Luft sehr autoxydabel sind. Zers. bei Raumtemp., sehr rasch beim Erwärmen.

C₈H₁₀N₃O₅]Cl (263.6) Ber. Cl 13.45 Gef. Cl 13.60

Erhitzt man die Mutterlauge der Hydrierung unter Luftzutritt, so gewinnt man den „Diazindophenol“-Farbstoff **2**, der wechselnde Mengen *N,N'*-Diacetyl-indigoidin **5** enthält (Dünnschichtchromatogramm).

6-Acetamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1.4)-4-[5-acetamino-2.6-dihydroxy-pyridyl-(3-imid)] (2): 2.0 g rohes, 17% Katalysator enthaltendes **14** werden durch rasches Lösen in 14 ccm gesätt. NaHCO₃-Lösung und Filtrieren vom Katalysator befreit. Mit der 3–4fachen Menge Eisessig wird angesäuert. Man erhitzt die Lösung 5 Min. auf 85–90°, wobei sich **2** in prächtig grünglänzenden Kristallen abscheidet, läßt auf 50° erkalten, saugt ab und wäscht mit Methanol. Ausb. 600 mg (47%). Der rohe Farbstoff (R_F 0.43) ist nach Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G, Butylacetat/Pyridin/Wasser 30 : 50 : 5) einheitlich. Die Nachfällung, welche man durch weiteres Abkühlen der Mutterlauge gewinnt, ist durch *N,N'*-Diacetyl-indigoidin **5** (R_F 0.94) verunreinigt. Zur Analyse wurde aus Eisessig umkristallisiert, Zers. (?) oberhalb 300°.

C₁₄H₁₃N₅O₆ (347.3) Ber. C 48.42 H 3.77 N 20.17 Gef. C 48.31 H 3.78 N 20.22

Der Modellfarbstoff **2** und das Bakterienpigment **1** stimmen — abgesehen von Löslichkeitsunterschieden — in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften weitgehend überein.

Eine Lösung von **14** in NaHCO₃-Lösung wird durch vollständige Autoxydation blaßgelb. Beim Ansäuern mit Eisessig und Erwärmen tritt keine Farbstoffbildung mehr ein. Mit Phenylhydrazin läßt sich ein Gemisch der Phenylhydrazone **12a** und **13a** ausfällen und elektronenspektroskopisch sowie dünnschichtchromatographisch identifizieren (Kieselgel G, Benzol/Dioxan/Eisessig 90 : 25 : 4).

Hydrierung von 2 mit Raney-Nickel: 232 mg **2** werden in 30 ccm *Acetanhydrid* bei 50° mit Raney-Nickel hydriert. Nachdem etwa 0.7–0.8 Äquivv. H₂ aufgenommen sind, wird unter O₂-Ausschluß vom Katalysator abgetrennt und noch 1 Stde. auf 100° erhitzt. Man dampft das Acetanhydrid i. Vak., zuletzt i. Hochvak. ab. Durch Zugabe von wenig Methanol und Wasser erhält man 150 mg grobkristallines farbloses *Acetyl-bis-[5-diacetylamino-2.6-diacetoxypyridyl-(3)]-amin*. Nach Trocknen bei 60° i. Vak. Schmp. 174–175°.

C₂₈H₂₉N₅O₁₃ (643.5) Ber. C 52.25 H 4.54 N 10.88 9 CH₃CO 60.20
Gef. C 52.30 H 4.60 N 10.66 CH₃CO 60.13

Mol.-Gew. 573 (osmometr. in THF), 643 (massenspektrometr.)

Hydrierung von 2 mit Pd-Katalysatoren

a) *In Eisessig*: 1.045 g **2** werden in 40 ccm Eisessig mit vorhydriertem PdO₂ (300 mg) 12–15 Stdn. hydriert, wobei 160 ccm (2.2 Äquivv.) H₂ aufgenommen werden und sich farblose Kristalle des *3-Amino-5-acetamino-2.6-dihydroxy-pyridin (9)* abscheiden, welche sich leicht

vom Katalysator abschlämmen lassen. Unter O₂-Ausschluß wird abgesaugt und mit trockenem Äther gewaschen. Erhitzt man eine kleine Menge **9** unter Luftzutritt in Eisessig, so bildet sich **2**, welches Spuren des Diacetylindigoidins **5** enthält.

Zur Charakterisierung wird das an feuchter Luft sehr autoxydable Amin **9** sofort unter Reinstickstoff acetyliert (15 ccm *Acetanhydrid*, 2 Stdn., 100°). Dennoch läßt sich die Bildung einer kleinen Menge Farbstoff (etwa 10 mg **5** und **2**) nicht verhindern. Man filtriert und dampft das Acetanhydrid i. Vak., zuletzt i. Hochvak., ab. Durch Zugaben von kleinen Mengen Methanol und Kühlen (−10 bis −15°) gewinnt man 400 mg (34%) *3.5-Bis-diacetylamino-2.6-diacetoxy-pyridin* in farblosen Kristallen. Schmp. 152°. Umkristallisiert aus wenig Methanol, Schmp. 160–161°, enthält das Produkt nur noch kleine Mengen Acetyl-bis-[5-diacetylamino-2.6-diacetoxy-pyridyl-(3)]-amin (NMR-Spektrum).

C₁₇H₁₉N₃O₈ (393.4) Ber. C 51.91 H 4.87 N 10.68 6 CH₃CO 65.65

Gef. C 51.77 H 4.46 N 10.83 CH₃CO 65.23

Mol.-Gew. 375 (osmometr. in THF)

Zur Identifizierung des in der Mutterlauge der Hydrierung als Hauptprodukt vorhandenen *3-Acetamino-2.6-dihydroxy-pyridins* (**8**), versetzt man mit einem Überschuß festen *Benzoldiazoniumchlorids*. Das sich bildende *5-Benzolazo-3-acetamino-2.6-dihydroxy-pyridin* (**12a**) färbt die Lösung intensiv gelb. Autoxydationsprodukte von noch vorhandenem Amin **9** (**5**, **2** u. a., etwa 100 mg) geben dem Reaktionsgemisch beim längeren Stehenlassen eine dunkle Farbe. Ein Teil der Lösung (1/50) wird mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G, Schichtdicke 0.5 mm, Benzol/Dioxan/Eisessig 90 : 25 : 4) aufgetrennt. Der gelbe Azofarbstoff **12a** wird mit Methanol eluiert und durch Elektronen- und IR-Spektrum mit authent. Präparat (s. o.) identifiziert. Ausb. photometrisch 15–20%.

b) In *Trifluoressigsäure*: Analog der Hydrierung des Pigmentes **1**²⁾ wird **2** (356 mg) mittels Pd/BaSO₄ (5-proz., 200 mg) in Trifluoressigsäure (30 ccm) hydriert. 2 Äquiv. H₂ werden rasch aufgenommen. Man trennt vom Katalysator ab. Nach Verdampfen der Trifluoressigsäure i. Vak. hinterbleibt eine farblose Gallerte. In dem Maße, wie man durch wiederholtes Suspendieren des Rückstands in reichlich THF und Abdampfen Reste der Trifluoressigsäure entfernt, färbt sich der Rückstand durch Autoxydation zunächst tiefblau. Durch längeres Rühren in THF erhält man schließlich eine rötliche Suspension von praktisch reinem *5.5'-Diacetamino-4.4'-dihydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2')* (*N.N'*-Diacetyl-indigoidin) (**5**) (215 mg), das nur Spuren von **2** enthält (Dünnschichtchromatogramm). Ausb. 59–60% (kolorimetrisch in DMF, bez. auf reines **5**). UV: λ_{max} 511 mμ (log ε 4.39)¹⁾.

3.5-Bis-diacetylamino-2.6-diacetoxy-pyridin: 200 mg **12a** werden mittels Raney-Nickel in 20 ccm *Acetanhydrid* hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators wird unter Stickstoff noch 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Das nach Abdampfen i. Vak. zurückbleibende Öl kristallisiert leicht bei Zugabe von wenig Methanol in großen farblosen Kristallen. Aus Methanol Schmp. 161°, Ausb. 120 mg (42%).

C₁₇H₁₉N₃O₈ (393.4) Ber. C 51.91 H 4.87 N 10.68 6 CH₃CO 65.65

Gef. C 52.04 H 5.19 N 10.89 CH₃CO 66.28

Das Produkt ist mit dem aus der Hydrogenolyse von **2** gewonnenen identisch (Schmp. der Mischprobe 159–160°, Elektronen-, IR- und NMR-Spektrum).

5-Benzolazo-3-octanoylamino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure (*Benzolazo-octanoylamino-citrazinsäure*) (**13b**): 850 mg fein gepulverte *3-Amino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure* (*Amino-citrazinsäure*) werden zusammen mit 6.75 g *Octansäureanhydrid* und 6 Tropfen BF₃-Ätherat kräftig gerührt, wobei man Luftzutritt möglichst vermeidet. Nach 14 Stdn. löst sich eine Probe beim

Verdünnen mit Methanol vollständig. Durch Zugabe von Benzol und Zentrifugieren trennt man *3-Octanoylamino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure* (*Octanoylamino-citrazinsäure*) (600 mg) ab, wäscht mit Benzol und trocknet i. Vak.

Das rohe Octanoylamino-Derivat (1.7 g) wird in Methanol (350 ccm) mit festem *Benzoldiazoniumchlorid* (etwa 1 g) versetzt. Beim Verdünnen mit Wasser (700 ccm) scheidet sich **13b** in gelben Nadeln ab. Die Säure wird zweimal aus ihrer verdünnten Na-Salzlösung mit verd. Salzsäure abgeschieden. Ausb. 1.4 g (60%), Zers. ab 200°.

$C_{20}H_{24}N_4O_5$ (400.4) Ber. C 59.99 H 6.04 N 13.99 Gef. C 59.86 H 6.02 N 14.10

5-Benzolazo-3-octanoylamino-2,6-dihydroxy-pyridin (**12b**): 50 mg **13b** werden mit 100 mg *Kupferbronze* verrieben und in einer Sublimationsbirne i. Hochvak. auf 200–210° erhitzt. Man erhält ein mikrokristallines ziegelrotes Sublimat (14 mg). Aus DMSO + 10% Wasser kristallisiert der *Azofarbstoff* in derben gelbbraunen Nadeln, Ausb. etwa 5 mg (11%), Zers. ab 200°. Er ist mit dem Phenylhydrazon des *Azachinons* **11** identisch (Elektronenspektrum; IR- und Röntgenspektrum, sofern beide Substanzen aus dem gleichen Lösungsmittel kristallisiert wurden).

3-Amino-5-octanoylamino-2,6-dihydroxy-isonicotinsäure (*Amino-octanoylamino-citrazinsäure*) (**15**): 400 mg **13b** werden in 8 ccm 2*n* NaOH mit Raney-Nickel hydriert (H_2 -Aufnahme 50 ccm in 3 Std.). Unter O_2 -Ausschluß wird vom Katalysator abgetrennt und **15** mit 2*n* HCl ausgefällt. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit kann im Gegensatz zur homologen Verbindung **14** an der Luft abgesaugt und mit Wasser gewaschen werden. Ausb. 305 mg (98%). Man kristallisiert aus Äthanol um und trocknet bei 100° i. Vak. Schmp. nicht bestimmbar, da rasche Autoxydation beim Erwärmen. UV (Methanol): λ_{max} 330 m μ (log ϵ 3.79).

$C_{14}H_{21}N_3O_5$ (311.3) Ber. C 54.01 H 6.80 N 13.50 Gef. C 54.04 H 6.95 N 13.76

6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1.4)-4-[5-octanoylamino-2,6-dihydroxy-pyridyl-(3)-imid] (**1**)

a) *Durch Kondensation von 11 mit 15*: 53 mg *Azachinon* **11**, gewonnen durch Pigmentabbau²⁾, werden mit 70 mg **15** in 2 ccm Eisessig erhitzt. Sofort entsteht eine tiefblaue Lösung, aus welcher **1** in bronzeglänzenden Kristallen ausfällt. Man wäscht mit Methanol, bis die Waschflüssigkeit schwach blau gefärbt ist. Ausb. 85 mg (80%), nach Trocknen bei 110°/1 Torr; Schmp. über 288° bei raschem Aufheizen.

$C_{26}H_{37}N_5O_6$ (515.6) Ber. C 60.56 H 7.23 N 13.58 Gef. C 60.47 H 7.42 N 13.54

b) *Aus 15*: Erhitzt man wenige mg **15** in Eisessig, so färbt sich die Lösung langsam blau und scheidet schließlich den Farbstoff **1** kristallin ab. Das Produkt wurde durch Elektronen- und IR-Spektrum identifiziert.

6-Octanoylamino-3-hydroxy-2-aza-benzochinon-(1.4)-4-[5-acetamino-2,6-dihydroxy-pyridyl-(3)-imid] (**3**): Analog der Synthese von **1** nach a) werden 58.5 mg (0.11 mMol) *Azachinon* **11** mit 45.4 mg (0.1 mMol) *Aminocarbonsäure* **14** kondensiert. Man erhält 60 mg **3**, welches **2** enthält (etwa 10–20%, NMR-Spektrum). Die Trennung der Farbstoffe gelingt dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel G, Butylacetat/Pyridin/Wasser 30 : 50 : 1). Der R_F -Wert von **3** ist gleich dem mittleren R_F -Wert von **1** und **2**.