

Untersuchungen an Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen, XVIII<sup>1)</sup>

## Zur Konstitutionsaufklärung der Pigmente vom Flexirubin-Typ – Massenspektrometrische Untersuchungen

Hans Achenbach\* und Werner Kohl

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.,  
Albertstr. 21, D-7800 Freiburg

Eingegangen am 20. März 1978

Es wird über die elektronenstoß-induzierte Fragmentierung von Pigmenten des Flexirubin-Typs<sup>1,2)</sup> und ihrer Derivate sowie die Bedeutung der Schlüsselfragmente für die Konstitutionsaufklärung berichtet.

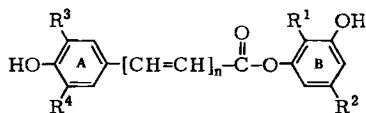
Investigations on Metabolites of Microorganisms, XVIII<sup>1)</sup>

The Mass Spectrometric Fragmentation of Flexirubin-type Pigments

This report describes the electron-induced fragmentation of flexirubin-type pigments<sup>1,2)</sup> and the structure informations deduced from key fragments.

Bisher sind in einigen Gleitenden Bakterien der *Cytophaga/Flexibacter*-Gruppe insgesamt mehr als 25 Pigmente vom Flexirubin-Typ aufgefunden worden. Häufig wurden dabei kompliziert zusammengesetzte, schwer trennbare Homologen-Gemische erhalten<sup>1,2)</sup>. Den Verbindungen liegen als Chromophor nicht-isoprenoide  $\omega$ -Phenylpolycarbonsäuren zugrunde, die mit 2,5-dialkylierten Resorcinen verestert sind. Relativ häufig werden auch chlorierte Verbindungen angetroffen.

Die Variationsbreite in den Konstitutionen – wie sie sich nach unseren bisherigen Erkenntnissen ergibt – ist aus **2** ersichtlich.



	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<b>1</b> (= Flexirubin)	8	n-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<b>2</b>	6-8	n-Alkyl oder Isoalkyl (C <sub>10</sub> , C <sub>11</sub> , C <sub>12</sub> )	n-Alkyl oder Isoalkyl (C <sub>1</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>6</sub> )	H oder CH <sub>3</sub>	H oder Cl

Bei der Konstitutionsermittlung der häufig nur in sehr geringer Menge zugänglichen Pigmente haben massenspektrometrische Studien eine wesentliche Rolle gespielt.

Zur EI-Massenspektrometrie sind im Prinzip schon die underivatisierten Pigmente 2 verwendbar: Infolge der relativ geringen Flüchtigkeit und der thermischen Instabilität sind die Spektren und ihre Qualität jedoch stark von den Aufnahmebedingungen abhängig. Diese Aussage gilt auch noch – allerdings in geringerem Maße – für die MS-Untersuchung der Dimethylether.

### Schlüsselfragment des nicht-isoprenoiden Polyens

Charakteristisch für den MS-Zerfall sowohl von 2 als auch von den entsprechenden Ethern ist der Verlust von 78 ME (= C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) aus den Molekül-Ionen, wie das abgebildete Beispiel des 1-Dimethylethers zeigt (Abb. 1).

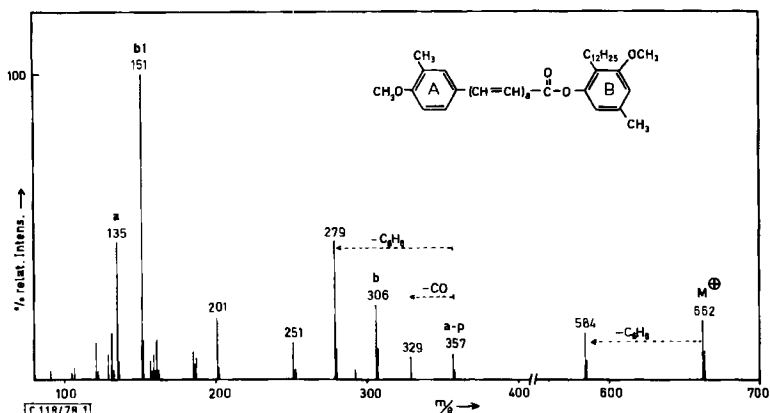
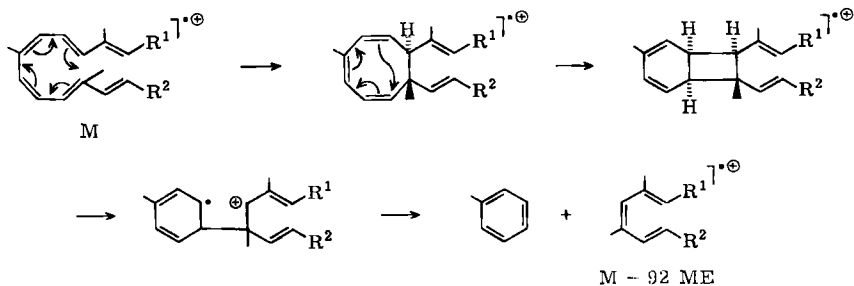


Abb. 1. Massenspektrum von Flexirubin-dimethylether (1-Dimethylether)  
(a - p = Ring A + Polyen)

Wir sehen diesen Fragmentierungsprozeß in Analogie zur bekannten Eliminierung von 92 ME (= Toluol) und 106 ME (= Xylol) aus der Polyenkette in den Massenspektren von Carotinoiden<sup>3,4</sup>. Die zugrunde liegende MS-Reaktion wird über einen elektro-cyclischen Mechanismus formuliert (Schema 1)<sup>4,5</sup>.



Schema 1. Mechanismus der elektronenstoß-induzierten Eliminierung von Toluol aus den Molekül-Ionen von Carotinoiden nach Lit.<sup>4,5</sup>

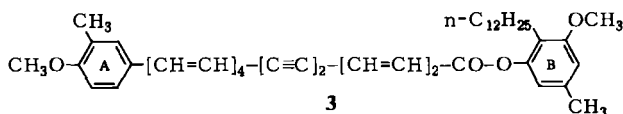
Die ausschließliche Abspaltung von 78 ME aus den Molekül-Ionen – und somit das Schlüsselfragment  $M - 78 \text{ ME}$  – in allen Pigmenten vom Flexirubin-Typ zeigt demnach den nicht-isoprenoiden Aufbau des Polyen-Teiles an.

Die Länge des Polyens ist im Bereich der vorliegenden Daten ( $n = 6 - 8$ ) ohne erkennbare Auswirkung auf die Intensität dieses Fragmentes relativ zum Molekül-Ion.

Andererseits steigt mit thermischer Belastung der Probe in der Ionenquelle des Massenspektrometers seine Intensität deutlich an.

Erwartungsgemäß erscheint das Schlüsselfragment des nicht-isoprenoiden Polyens nicht mehr in den Produkten der katalytischen Hydrierung von **2** bzw. deren Derivaten.

Auch der Einbau von Dreifachbindungen – wie z. B. im synthetischen 6,7,8,9-Tetrahydroflexirubin-dimethylether (**3**) – verhindert die MS-induzierte Eliminierung von Teilen der ungesättigten Kette<sup>6)</sup>.



### Schlüsselfragmente der substituierten Benzolringe A und B

Nach der Hydrierung vereinfacht sich das Massenspektrum erheblich, wie Abb. 2 zeigt.

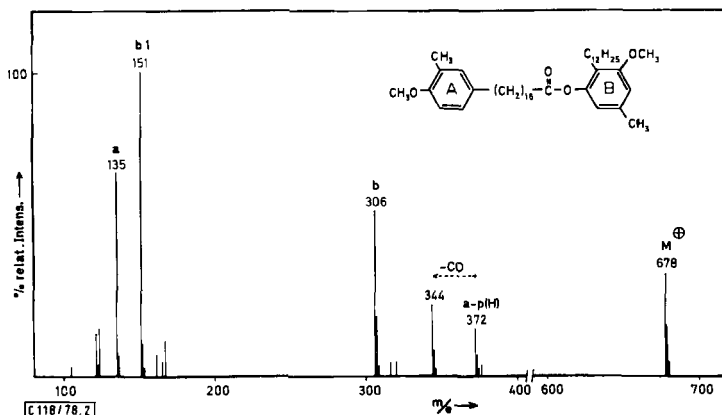
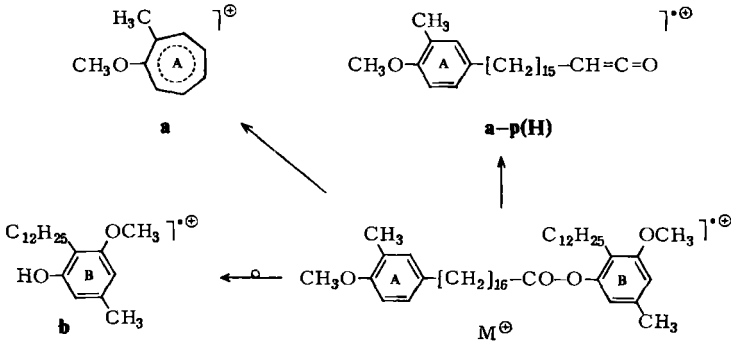


Abb. 2. Massenspektrum von Hexadecahydroflexirubin-dimethylether  
[ $a - p(H)$  = Ring A + hydriertes Polyen]

Die MS-Fragmentierung ist jetzt gekennzeichnet durch den Bruch der Esterbindung, wobei primär die Schlüsselfragmente **a** (Ring A),  $a - p(H)$  (Ring A + hydriertes Polyen) und **b** (Ring B) entstehen (Schema 2).

Aus den angegebenen Formeln wird die Bedeutung der Ionen für die Konstitutionsermittlung der Pigmente ersichtlich.

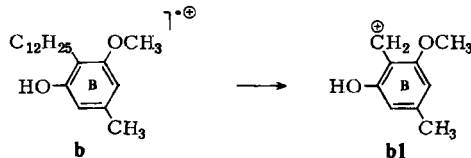
Die Spaltung der Esterbindung kann formal als McLafferty-Umlagerung aufgefaßt werden. Wir halten aber die angegebene Formulierung für **b** im Hinblick auf spezielle Untersuchungen an den MS von Phenolacetaten für berechtigt<sup>7)</sup>.



Scheme 2. Primäre Schlüsselfragmente der elektronenstoß-induzierten Fragmentierung von Hexadecahydroflexirubin-dimethylether [ $\text{a-p(H)}$  = Ring A + hydriertes Polyen]

Eine Verschiebung der Doppelbindung in  $\text{a-p(H)}$  schafft die Voraussetzung für eine leichte sekundäre Eliminierung von CO aus diesem Ion.

Basis-Peak im Massenspektrum ist das Folge-Ion **b1** aus **b**, dessen benzyliche Gruppierung erwartungsgemäß einen günstigen Angriffspunkt bildet.

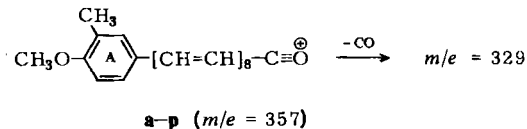


**b1** ist nicht von einem geradzahigen Ion bei ( $\text{b1} + \text{H}$ ) begleitet: Die Spaltung des Alkylsubstituenten  $\text{R}^1$  erfolgt also mechanistisch einheitlich und ohne H-Transfer. Diese Feststellung ist keineswegs trivial; sie bietet die Voraussetzung für die massenspektrometrische Unterscheidung zwischen  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$ , wenn es sich in beiden Fällen um größere Alkylreste handelt (s. u.).

Ganz entsprechende Schlüsselfragmente wie in Schema 2 werden auch in den Spektren der ursprünglichen – nicht-hydrierten – Pigmente beobachtet. Der Bruch an der Esterbindung kann dann aber offensichtlich mit und auch ohne H-Transfer erfolgen:

Der Verlauf der Esterspaltung unter H-Transfer führt wiederum zu den Ionen **b** und **b1**.

Demgegenüber ist das den Polyenteil mit Ring A enthaltende Fragment  $\text{a-p}$  in den nicht-hydrierten Pigmenten ungeradzahlig – also im Zuge eines einfachen Bindungsbruches ohne H-Umlagerung entstanden. Mit der angegebenen Acylium-Form ist auch hier der sekundäre Verlust von CO in Übereinstimmung (Abb. 1:  $m/e$  357  $\rightarrow$   $m/e$  329).



Neben den Fragmenten  $\text{a-p}$  und  $\text{a-p}$  minus CO werden noch Ionen beobachtet, die formal  $\text{C}_6\text{H}_6$  weniger enthalten – also entweder aus  $\text{M} - 78 \text{ ME}$ , dem Schlüsselfrag-

ment des nicht-isoprenoiden Polyens (s. o.), durch entsprechende Spaltung der Esterbindung oder aber im Zuge der sekundären  $C_6H_6$ -Eliminierung aus  $a-p$  entstanden sind. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden möglichen Zerfallswegen anhand metastabiler Signale war bisher nicht möglich.

Hinzuweisen wäre noch auf das Ion bei  $m/e = 201$  (Abb. 1), das formal einer zweifachen  $C_6H_6$ -Eliminierung aus  $a-p$  entspricht. In den MS von Heptaenen ( $2, n = 7$ ) ist das vergleichbare Ion relativ weniger intensiv; bei Hexaenen ( $2, n = 6$ ) wird es nicht mehr beobachtet.

Die Bildung des Ions  $a$  aus  $M^+$  oder  $a-p$  setzt H-Umlagerungen innerhalb der Polyenkette voraus.

### Unterscheidbarkeit der Alkyl-Substituenten $R^1$ und $R^2$

Bei der Mehrzahl der bisher aufgefundenen Pigmente vom Flexirubin-Typ sind beide Substituenten des Benzolringes  $B$  längere Alkyl-Reste (siehe 2).

In diesen Fällen kann ein sekundärer Zerfall von  $b$  nicht nur an  $R^1$ , sondern auch an  $R^2$  stattfinden; im Massenspektrum tritt neben  $b1$  dann ein weiteres Ion  $b2$  auf, und zwar sowohl in den Massenspektren der nicht-hydrierten Pigmente (z. B. Abb. 3) als auch nach der Hydrierung (z. B. Abb. 5).

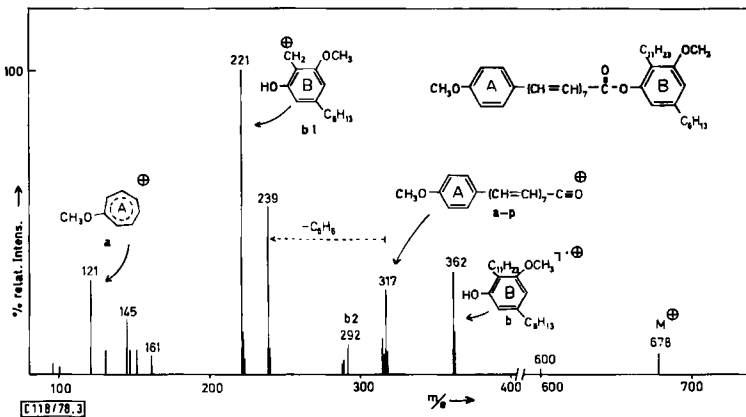
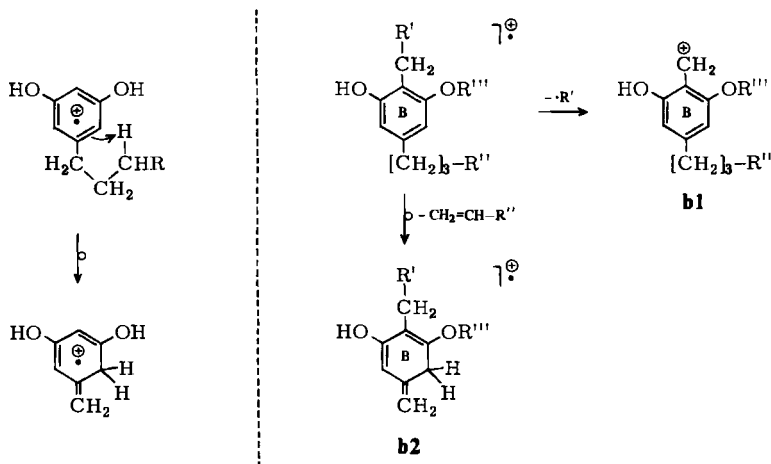


Abb. 3. Massenspektrum des methylierten Hauptpigmentes aus *Cytophaga johnsonae*<sup>8)</sup>

$b2$  muß im Zuge eines Umlagerungsmechanismus entstanden sein, denn es ist stets geradzahlig.

In diesem Zusammenhang kann auf systematische Untersuchungen von *Oocolowitz* zurückgegriffen werden, die gezeigt hatten, daß in den Massenspektren von 5-Alkylresorcinen der Alkylsubstituent ausschließlich unter H-Transfer an der benzylicsen Bindung gespalten wird<sup>9)</sup>.

Da  $b1$  und  $b2$  aufgrund ihrer verschiedenen Bildungsmechanismen klar unterscheidbar sind, eröffnet hier die Massenspektrometrie eine Möglichkeit für die eindeutige Zuordnung von Alkylsubstituenten in 2,5-dialkylierten Resorcinen. Der Zerfall erfolgt offensichtlich nach Schema 3 sowohl primär als auch sekundär (wie im vorliegenden Falle aus  $b$ ).

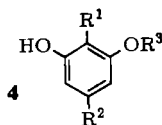


Schema 3. Schlüsselfragmente des primären Zerfalls von 5-Alkylresorcinen nach Lit.<sup>9)</sup> sowie des primären und sekundären Zerfalls von 2,5-dialkylierten Resorcinen ( $R''' = \text{H}$  oder  $\text{CH}_3$ )

Von der allgemeinen Gültigkeit dieser Aussage haben wir uns durch MS-Untersuchung der 2,5-dialkylierten Resorcine bzw. Resorcin-monomethylether **4a–g** überzeugt, die aus anderen Gründen synthetisiert worden sind<sup>1, 10)</sup>.

Die interessierenden MS-Daten der Verbindungen **4** sind in Tab. 1 zusammengestellt; sie bestätigen in jeder Beziehung unsere Überlegungen. Alle Übergänge von den Molekül-Ionen zu den Schlüsselfragmenten **b1** und **b2** sind metastabil.

Tab. 1. Schlüsselfragmente einiger synthetisierter 2,5-dialkylierter Resorcine bzw. Resorcin-monomethylether



Substanz $R^3$	Substituenten		Schlüsselfragmente im MS		
	$R^1$	$R^2$	<b>b1</b>	<b>b2</b>	
<b>4a</b>	H	$[\text{CH}_2]_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$[\text{CH}_2]_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	<i>m/e</i> 207	<i>m/e</i> 278
	$\text{CH}_3$	$[\text{CH}_2]_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$[\text{CH}_2]_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	221	292
<b>b</b>	H	$[\text{CH}_2]_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	193	278
	$\text{CH}_3$	$[\text{CH}_2]_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	207	292
<b>c</b>	H	$n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$	$[\text{CH}_2]_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	207	264
	$\text{CH}_3$	$n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$	$[\text{CH}_2]_3\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	221	278
<b>d</b>	H	$n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	193	264
	$\text{CH}_3$	$n\text{-C}_{10}\text{H}_{21}$	$n\text{-C}_5\text{H}_{11}$	207	278
<b>e</b>	H	H	$n\text{-C}_6\text{H}_{13}$	—	124
<b>f</b>	H	$n\text{-C}_6\text{H}_{13}$	$n\text{-C}_4\text{H}_9$	179	208
<b>g</b>	H	$n\text{-C}_7\text{H}_{15}$	$n\text{-C}_3\text{H}_7$	165	222

Das diskutierte Fragmentierungsverhalten der Pigmente vom Typ 2 hat erhebliche Bedeutung für die Ermittlung der Konstitutionen. Aus massenspektrometrischen Untersuchungen lassen sich anhand von Schlüsselfragmenten folgende Informationen gewinnen:

- Erkennung des nicht-isoprenoiden Polyens – Schlüsselfragment M – 78 ME
- Länge der Polyenkette – Schlüsselfragmente a–p (bzw. a–p(H)) und a
- Substitution am Ring A – Schlüsselfragment a
- Substitution am Ring B – Schlüsselfragment b
- Größe des Alkylsubstituenten R<sup>1</sup> – Schlüsselfragment b 1
- Größe des Alkylsubstituenten R<sup>2</sup> – Schlüsselfragment b 2

Auch die MS-Untersuchung von Gemischen aus 2 ist sehr instruktiv und erlaubt ein gezieltes Vorgehen für die weiteren Trennoperationen, wie die folgenden Beispiele zeigen sollen: Im Zuge der Chromatographie des Rohpigmentes aus *Cytophaga johnsonae* fiel

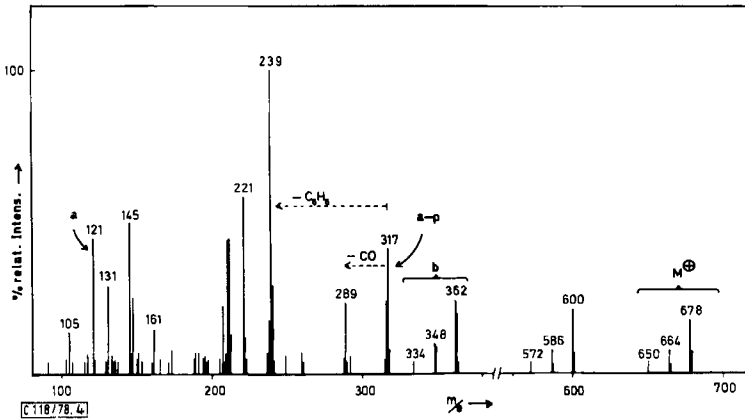


Abb. 4. Massenspektrum der methylierten Komponente P 10-B aus *Cytophaga johnsonae*<sup>2)</sup>

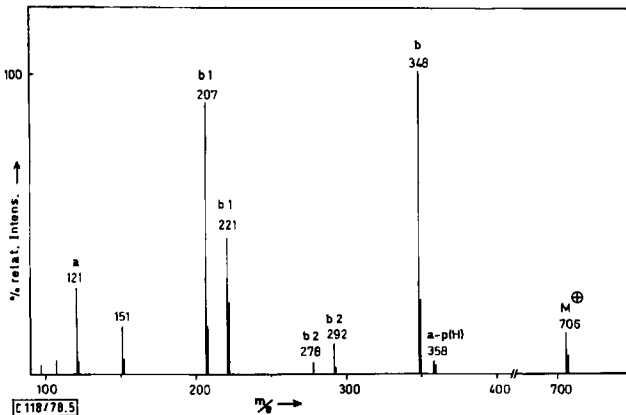


Abb. 5. Massenspektrum der hydrierten HPLC-Fraktion P 16-2 aus *Cytophaga spec.* Stamm Samoa<sup>1)</sup>

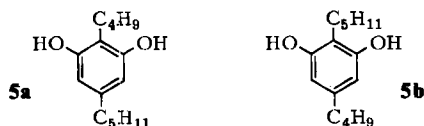
die Komponente P 10-B an<sup>2)</sup>, die mit herkömmlichen Mitteln nicht weiter auftrennbar war. Das Massenspektrum (Abb. 4) läßt erkennen, daß ein Gemisch aus drei homologen nicht-isoprenoiden Verbindungen des Typs 2 vorliegen muß. Die Homologen besitzen gleiche Polynlängen ( $n = 7$ ) und gleiche Substitution im Bereich des Ringes A; sie unterscheiden sich in der Größe der Alkylsubstituenten am Ring B. Die Trennung des Gemisches gelang dann später durch Hochdruckflüssigchromatographie (= HPLC).

In Abb. 5 ist das Massenspektrum einer katalytisch hydrierten, HPLC-reinen Pigmentfraktion aus *Cytophaga spec.* Stamm *Samoa* wiedergegeben.

Interessant ist in diesem Falle das Auftreten von je zwei Ionen für **b1** und **b2**: Es muß ein Isomerengemisch vorliegen aus zwei Isomeren mit gleichem Grundgerüst und außerdem  $R^1 + R^2 = C_{16}H_{34}$ . Die anhand der Schlüsselfragmente für die Isomeren abgeleiteten Konstitutionen wurden durch Kapillar-GC von Abbauprodukten bestätigt<sup>1)</sup>.

#### Anmerkung

Unsere Untersuchungen über die MS-Fragmentierung von alkylierten Resorcinen erlauben auch die Festlegung der Konstitution des Stempols aus *Stemphylium majusculum*, für das die isomeren Formeln **5a** und **5b** diskutiert werden<sup>1)</sup>: Die publizierten MS-Daten sind nur mit **5a** zu vereinbaren.



Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

### Experimenteller Teil

Massenspektren: CH-4-Massenspektrometer (Fa. Varian-MAT), Ionenquelle TO 4, Ionisierungsenergie 70 eV; Einlaß der Substanzen je nach Flüchtigkeit über Ofenschleuse oder HTE-Einlaß. Für Substanzen mit Molmassen über 500: Doppeltfokussierendes Massenspektrometer vom Typ SM 1 B (Fa. Varian-MAT) bei einer Auflösung von  $M/\Delta M = 1000$ ; Ionenquelle EH 1, Ionisierungsenergie 70 eV, Temp. der Ionenquelle 180°C, Einlaßsystem: Schubstange, Proben-temp. 110–200°C. Angegeben sind die Daten im allgemeinen für  $m/e > 100$  und, soweit es sich nicht um  $M^+$  handelt, für relat. Intensitäten  $> 5\%$ .

*Herkunft der untersuchten Substanzen:* Die Darstellung der zur MS verwendeten Substanzen ist an anderen Stellen beschrieben, die im Text jeweils angegeben sind. Dort finden sich auch die genauen MS-Daten.



## Literatur

- <sup>1)</sup> XVII. Mittel.: *H. Achenbach, W. Kohl, S. Alexanian und H. Reichenbach*, *Chem. Ber.* **112**, 196 (1979), vorstehend.
- <sup>2)</sup> *H. Achenbach, W. Kohl, W. Wachter und H. Reichenbach*, *Arch. Microbiol.* **117**, 253 (1978), und dort zitierte Literatur.
- <sup>3)</sup> Siehe z. B. *U. Schwieter, H. R. Bolliger, L. H. Chopard-dit-Jean, G. Englert, M. Kofler, A. König, C. v. Planta, R. Rüegg, W. Vetter und O. Isler*, *Chimia* **19**, 294 (1965).
- <sup>4)</sup> *W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi und W. Schwieter* in *Carotenoids* (Herausgeber *O. Isler*), S. 243 ff., Birkhäuser Verlag, Basel 1971.
- <sup>5)</sup> Siehe z. B. *B. Johannes, H. Brezinka und H. Budzikiewicz*, *Org. Mass Spectrom.* **9**, 1095 (1974).
- <sup>6)</sup> *H. Achenbach und J. Witzke*, *Angew. Chem.* **89**, 198 (1977); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **16**, 191 (1977).
- <sup>7)</sup> *A. A. Gamble, J. R. Gilbert und J. G. Tillett*, *J. Chem. Soc. B* **1970**, 1231.
- <sup>8)</sup> *H. Achenbach, W. Kohl und H. Reichenbach*, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1061.
- <sup>9)</sup> *J. L. Ocolowitz*, *Anal. Chem.* **36**, 2177 (1964).
- <sup>10)</sup> *H. Achenbach und W. Kohl*, *Chem. Ber.* **112** (1979), im Druck.
- <sup>11)</sup> *F. H. Stodola, D. Weisleder und R. F. Vesonder*, *Phytochemistry* **12**, 1797 (1973).