

Isolierung und spektroskopische Charakterisierung des Pyoverdin-Chromophors sowie seines 5-Hydroxy-Analogen [1]

Isolation and Spectroscopic Characterization of the Pyoverdin Chromophore and of Its 5-Hydroxy Analogue [1]

J. Michels, H. Benoni, G. Briskot, J. Lex, H. Schmickler, K. Taraz und H. Budzikiewicz*

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

H. Korth und G. Pulverer

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Goldenfelsstraße 21, D-5000 Köln 41

Z. Naturforsch. **46c**, 993–1000 (1991); eingegangen am 16. Juni 1991

Pseudomonas, Pyoverdins, Spectral Data

The isolation of the common chromophore of the pyoverdins isolated from iron-deficient cultures of fluorescent *Pseudomonas* strains and of its 5-hydroxy analogue as well as the spectroscopic characterization of the two compounds is described.

Einleitung

Für die Peptidsiderophore der sogenannten Fluoreszentengruppe der Gattung *Pseudomonas* (gewöhnlich als Pyoverdine, gelegentlich als Pseudobactine bezeichnet) wird in der Literatur [1–11] angegeben, daß sie (1S)-5-Amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolin-1-carbonsäure (**1**) als gemeinsamen Baustein enthalten. Die Autoren beziehen sich dabei auf die Röntgenstrukturanalyse des aus Eisenmangelkulturen von *Pseudomonas* B 10 isolierten Pseudobactins [2], bei dem an die Carboxylgruppe von **1** ein Hexapeptid und an die Aminogruppe Succinamid amidisch gebunden ist. Die Korrelation mit neu isolierten Siderophoren, die sich sowohl im Peptidteil als auch in der Säuregruppe unterscheiden, erfolgt gewöhnlich durch Vergleich der UV- und NMR-Spektren mit den für Pseudobactin angegebenen Daten. (Da Daten für **1** oder **2** selbst in [2] nicht angegeben worden sind, erfolgte nie eine direkte Korrelation). Versuche der Isolierung von **1** durch Hydrolyse waren bisher fehlgeschlagen; erhalten wurde stets **2**, bei dem die Aminogruppe von **1** gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht ist.

Synthetisch konnte nur ein an allen funktionellen Gruppen geschütztes Derivat von racemischen **1** erhalten werden [12]. Im folgenden möchten wir über die Isolierung sowie die spektroskopische Charakterisierung von **1** und **2** berichten, welche bei dem großen Interesse, dessen sich die *Pseudomonas*-Siderophore neuerdings erfreuen, eine eindeutige Charakterisierung, aber auch bei Biogeneuntersuchungen mit Hilfe von isotopen-markierten Substraten die Identifizierung jedes einzelnen Atoms ermöglichen sollte.

Ergebnisse und Diskussion

(1S)-2,3-Dihydro-5,8,9-trihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolin-1-carbonsäure (**2**)

Diese Verbindung erhält man durch Hydrolyse der verschiedenen Pyoverdine mit HCl bei 110 °C (2 N, 6 Tage [8, 13] vergl. auch Exp. Teil).

Massenspektrometrie

Ein EI-Spektrum erhält man nur bei sehr schnell Aufheizen der Probe („flash-Verdampfung“) und nur für einen kurzen Zeitraum. Entsprechend variieren die relativen Intensitäten der verschiedenen Ionen von Messung zu Messung und von Gerät zu Gerät (ein Beispiel findet sich in Ref. [8]). M^+ (m/z 276) ist nicht immer zu erkennen, $[M - H_2O]^+$ (m/z 258) und $[M - 2 H_2O]^{++}$ (m/z 240) sind von geringer Intensität. Intensivstes Ion ist stets $[M - CO_2]^{+}$ (m/z 232 begleitet von $[M - COOH]^{+}$ (m/z 231), die beide CO verlieren (m/z 204/203). Charakteristisch sind ferner der Verlust von

Abkürzungen: DMF, Dimethylformamid; DMSO, Dimethylsulfoxid; DSS, Na-Trimethylsilylpropan-sulfonat; FAB, Fast Atom Bombardment; EI, Elektronenionisation.

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939-5075/91/1100-0993 \$ 01.30/0

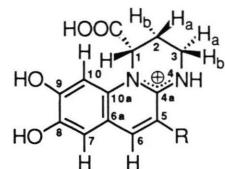


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

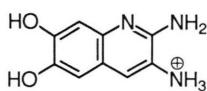
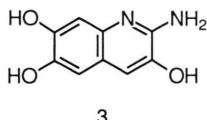
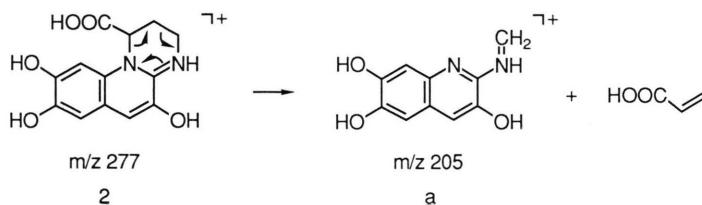
This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



1: R = NH₂

2: R = OH



4

$\text{C}_3\text{H}_3\text{COOH}$ (m/z 192) und von $\text{N}-\text{C}_3\text{H}_4-\text{COOH}$ (m/z 177) aus dem Tetrahydropyrimidinring sowie [m/z 177 - CO]⁺ (m/z 149).

Im positiv-FAB-Spektrum ist $[M + H]^+$ Basis-
ion (m/z 277, $C_{13}H_{13}N_2O_5$; alle angegebenen Ele-
mentarzusammensetzungen sind durch exakte
Massenmessungen bestätigt, Abweichungen von
den berechneten Werten $< 0,5$ mmu), das CO_2 ,
 $CO_2 + H$ und $CO_2 + 2H$ verliert (m/z 231–233,
 $C_{12}H_{11-13}N_2O_3$). Von besonderem Interesse sind
zwei Ionen, nämlich m/z 205 ($C_{10}H_9N_2O_3$) und 261
($C_{13}H_{13}N_2O_4$). Das Ion m/z 205 (**a**) entsteht durch
retro-Diels-Alder-Zerfall, wie er auch bei Pyover-
dinen beobachtet wird [6–8]. Bildung von **a** ist, da-
ein entsprechendes Ion im EI-Spektrum fehlt, of-
fensichtlich nur ausgehend von protoniertem **1**
bzw. **2** möglich (auch in den FAB-Spektren der
Pyoverdine liegt **1** protoniert vor); daß es sich bei **a**
um ein echtes Fragment und nicht um ein thermi-
sches Zerfallsprodukt handelt, konnte durch stoß-

aktivierten Zerfall von $[M + H]^+$ gezeigt werden. Das Ion m/z 261 stammt von einem durch reduktive Entfernung einer Hydroxylgruppe in der FAB-Matrix entstandenen Artefakt [14] (da m/z 261 ebenso wie m/z 277 nach Stoßaktivierung Acrylsäure verliert – vgl. **2 → a** –, muß eine phenolische OH-Gruppe entfernt worden sein); daß das Desoxyprodukt keine native Beimengung ist, folgt aus dem HPLC-Chromatogramm sowie dem Fehlen eines zusätzlichen Aromatensignals im 1H -NMR-Spektrum. Bei der Strukturermittlung neuer Pyoverdine muß man somit mit derartigen Prozessen rechnen. Dies ist von Bedeutung, da Tyr und Dab die Vorläufer von **1** sind und 8-Deshydroxy-**1** ein Zwischenprodukt sein könnte [11].

¹H-NMR-Spektren von **2** sind in Tab. I zusammengefaßt. Sie sind sowohl lösungsmittel- als auch pH-abhängig. Die Analyse und Zuordnung des 5-Spin-Systems der aliphatischen Protonen ist bereits in der Literatur beschrieben [13]. Die Aroma-

Tab. I. ^1H -NMR-Daten von **2** und **1**.

Verbindung	2	2	2	2	1	Kopplungskonstanten ^c [Hz]
Lösungsmittel	DMSO-d ₆	DMF-d ₇	1 N DCl [21]	0,2 N DCl [12]	1 N DCl [21]	
Standard	2,49	2,74	DSS-d ₆ ; 0,00	=	=	(Kopplung mit:)
HO-(NH ₂)-5	11,79	12,41	—	—	—	
HO-8 ^b	10,17	10,53	—	—	—	
HO-9 ^b	9,79	10,08	—	—	—	
NH	9,26	9,32	—	—	—	
H-6	7,37	7,64	7,00	7,31	7,99	
H-7	7,08	7,20	6,76	7,11	7,04	
H-10	6,99	7,19	6,89	7,05	7,02	
H-1	5,63	5,87	5,62	5,71	5,77	2a : 4,8; 2b : 1,8
H-3b	3,61	3,86	3,79	3,69	3,84	3a : -14,0; 1 : 1,1
H-3a	3,17	3,44	3,46	3,44	3,49	2b : 4,0; 1 : 0,4
H-2b	2,57	^a	2,83	2,83	2,87	3b : 1,8; 2a : -14,0
H-2a	2,29	2,55	2,38	2,40	2,45	3a : 13,0; 3b : 5,4

^a Verdeckt vom DMF-Signal (2,74).^b Zuordnung nicht eindeutig.^c Für **1** und **2** gleich.

tenprotonen konnten durch Differenz-NOE-Messungen zugeordnet werden (Einstrahlen bei H-1 führt zu einem positiven NOE bei H-10, Einstrahlen bei H-6 zu einem solchen bei H-7; H-6 liegt gegenüber H-7 bei tieferem Feld wegen der γ -Stellung zum Chinolin-N, vgl. auch die Diskussion bei **1**). Die Zuordnung des NH-Protons erfolgte durch Doppelresonanzexperimente, die eine Kopplung mit H-3b (nicht aber mit H-3a) nachwiesen (Modelle zeigen einen Diederwinkel von ca. 15° zwischen NH und H-3b und von 85° für H-3a). Das bei tiefstem Feld gelegene OH-Signal muß

man wegen der räumlichen Nähe zum positiv geladenen Amidinsystem OH-5 zuordnen. Eine eindeutige Identifizierung der OH-Gruppen des Brenzcatechin-Systems war nicht möglich, da Entkopplungsexperimente (Einstrahlung bei den Resonanzen von H-7 bzw. H-10) wegen der Breite der OH-Signale zu keinem eindeutigen Ergebnis führten. Ebenso waren NOE-Experimente zwischen NH und OH-5 erfolglos.

^{13}C -NMR-Spektren von **2** sind in Tab. II zusammengefaßt. Hier ist die Lösungsmittelabhängigkeit nicht so stark ausgeprägt wie bei den ^1H -Spektren.

Tab. II. ^{13}C -NMR-Daten von **2** und **1**.

Verbindung	2	2	2	3^b	1	4^b
Lösungsmittel	DMSO-d ₆	DMF-d ₇	1 N DCl		1 N DCl	
Standard	39,5	30,1	DSS-d ₆ ; -1,61	=	22,1	
C-2	21,1	22,0	22,6		37,3	
C-3	35,2	^a	36,6		58,3	
C-1	55,7	56,9	57,4			
C-10	100,5	101,5	101,7	111,1	101,9	113,5
C-7	111,6	112,7	113,7	109,6	115,0	111,5
C-6a	114,9	116,3	117,2	120,2	116,2	116,2
C-6	115,6	116,6	117,8	116,5	134,8	129,2
C-10a	126,7	127,8	128,6	141,5	133,1	146,3
C-5	137,9	139,2	138,9	139,4	116,9	111,8
C-8	144,6	146,0	144,7	142,9	145,3	144,4
C-4a	145,6	146,9	147,7	158,7	147,9	160,1
C-9	148,4	149,7	148,6	148,0	152,7	152,7
CO	170,2	170,9	173,4		172,9	

^a Verdeckt vom DMF-Signal (30,1).^b Berechnet (s. Text).

Die Zuordnung der aliphatischen C-Atome sowie der aromatischen CH-Gruppen erfolgte durch ^{13}C -DEPT (Unterscheidung von CH- und CH_2) sowie durch heteronukleare Doppelresonanzexperimente (Einstrahlen bei den Frequenzen der entsprechenden Protonen – s. Tab. I). Die Zuordnung der quaternären aromatischen C-Atome gelang mit Hilfe von low-power heteronuklearen EinstrahlExperimenten, wobei die $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen mit den Protonen der übernächsten CH-Gruppen aufgehoben werden [15] (Einstrahlen bei H-6 führt zu einer Verschärfung der Signale von C-4a und C-10a, bei H-7 von C-9 und C-10a und bei H-10 von C-8 und C-6a) sowie durch vergleichende Betrachtung der ^{13}C -NMR-Spektren von **1** und **2** mit denen der Pyoverdine sowie deren Hydrolyseprodukte [16]. Bestätigt werden die Zuordnungen durch Inkrementrechnungen [17] für **3** ausgehend von den Verschiebungswerten für Chinolin [15] und den Inkrementen für monosubstituierte Naphthalinderivate [15, 18]. Größere Abweichungen zwischen den berechneten Werten für **3** und den gemessenen für **2** ergeben sich nur für C-4a, C-10 und C-10a, wo sich der Einfluß des dritten Ringes bemerkbar macht.

^{15}N -NMR-Spektren von **2** können wegen der geringen Häufigkeit von ^{15}N nur von konzentrierten Lösungen erhalten werden (DMSO-d_6). Zusätzlich ist eine Empfindlichkeitssteigerung z. B. durch DEPT notwendig. Hierzu ist die Kenntnis der $^nJ_{\text{NH}}$ -Kopplungskonstanten (hier $^1J_{\text{NH}}$ mit H-4 bzw. $^2J_{\text{NH}}$ mit H-1 erforderlich). Da für die spezifischen Systeme die Kopplungskonstanten nicht bekannt und auch wegen der Linienbreite nicht mit Hilfe der ^{15}N -Satelliten der ^1H -Signale H-1 bzw. H-4 ermittelt werden konnten, wurden Versuche mit Standardwerten (70–95 Hz für $^1J_{\text{NH}}$ und 0,5–16 Hz für $^2J_{\text{NH}}$ [19, 20]) durchgeführt. Erfolgreich waren nur Experimente mit 75 Hz für $^1J_{\text{NH}}$, die zu einem Signal bei $-284,9$ ppm (relativ zum externen Standard CH_3NO_2) führten, das N-4 zugeordnet werden kann. Dieser Wert liegt in dem für amidinartige Systeme typischen Bereich von -270 bis -300 ppm [19].

Röntgenstrukturanalyse

Die Elementarzelle ist triklin und besitzt kein Symmetriezentrum, obwohl die beiden unabhängigen Moleküle von **2** angenähert zentrosymme-

trisch zueinander angeordnet sind. Bemerkenswert ist die Anwesenheit von 10 Molekülen Kristallwasser in der Elementarzelle, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Heteroatomen von **2** ein dreidimensionales Netzwerk bilden (siehe Abb. 1 und 2). Diese Vernetzung ist notwendig für die Stabilität der Kristalle, die nur beständig sind, wenn sie von einer gesättigten Lösung bedeckt werden (vgl. [21, 22]). Die Strukturdaten finden sich im Exp. Teil. Die Röntgendiffraktionsdaten erlauben nur die Feststellung der chiralen Einheitlichkeit, nicht aber der absoluten Konfiguration. Kristalle, die ein Schweratom enthalten, konnten bisher nicht gezüchtet werden.

CD-Spektren

2 besitzt ein Chiralitätszentrum. Für Pseudobactin [2] wurde röntgenographisch S-Konfiguration bestimmt, die ORD- oder CD-Spektren des daraus isolierten Chromophors (**1** oder **2**) jedoch nicht ermittelt. Die Identität von **2** isoliert aus Pyoverdin I–III und aus Pyoverdin C, D und E (= PaB, PaA und Pa) konnte durch direkten Vergleich festgestellt werden. Sie zeigen identische CD-Spektren ($\Delta\varepsilon = +0,6$ bei 365 nm, $-0,9$ bei 296 nm und $-1,8$ bei 253 nm) [9]. Kürzlich konnten wir aus dem Kulturfiltrat eines *Pseudomonas fluorescens*-Stamms Pseudobactin [2] isolieren [23], dessen CD-Spektrum mit dem in [2] angegebenen übereinstimmt. Damit ist zumindest für die Pyoverdine I–III [8] und C–E [9] die S-Konfiguration an C-1 des Chromophors gesichert.

Auf unabhängigem Weg ließ sich die C-1-Konfiguration von **2** durch ozonolytischen Abbau bestimmen. Wie für Chinolinderivate beschrieben [25], werden die heterocyclischen Ringe nur langsam angegriffen (24 Stunden Reaktionszeit). Erwartet wurde, daß beim Abbau des Tetrahydropyrimidinringes 2,4-Diaminobuttersäure (Dab, ggf. als N-Formyllderivat, das bei der sauren Aufarbeitung jedoch gespalten werden sollte) entsteht. Saurer Medium während der oxidativen Aufarbeitung ist wichtig, um Racemisierung zu vermeiden. Zur Analyse wurde das Reaktionsgemisch N-trifluoracetyliert, mit Isopropanol verestert und gaschromatographisch untersucht. Das Fragmentierungsmuster einer Fraktion entsprach bei gleicher Retentionszeit dem von authentischem N,N'-Bis(trifluoracetyl)-1,4-diaminobuttersäureisopropyl-

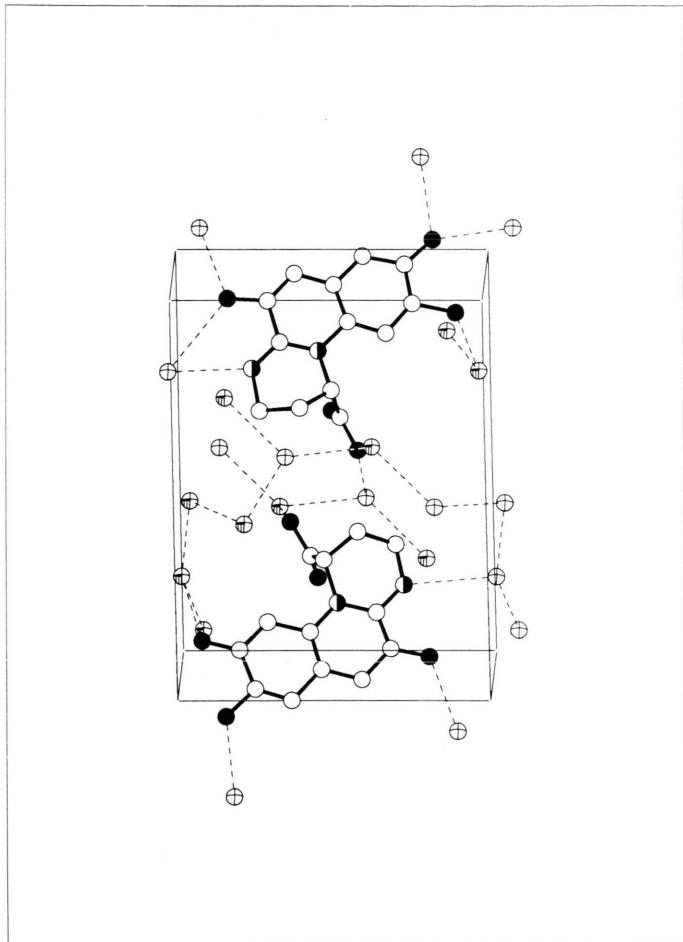


Abb. 1. Elementarzelle von $C_{13}H_{12}N_2O_5 \cdot 5 H_2O$. ●: Sauerstoffatom in 2; ○: Stickstoffatom in 2; ⊕, +: Sauerstoffatom des Kristallwassers innerhalb (außerhalb) der Elementarzelle; ---: Wasserstoffbrückenbindung. Der maximale N,O...O-Abstand beträgt 3.2 Å [24].

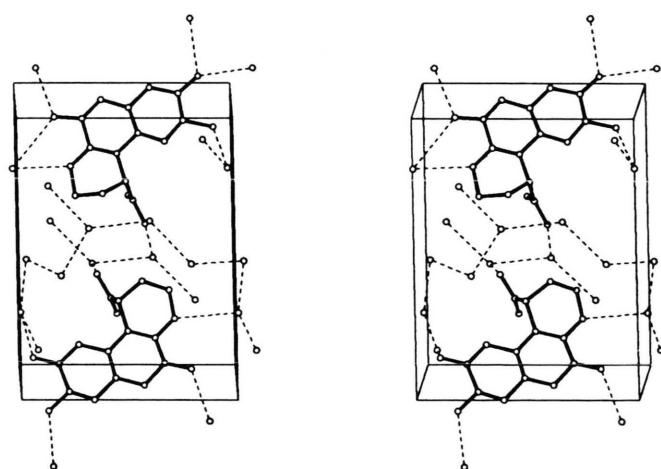


Abb. 2. Stereobild der Elementarzelle von $C_{13}H_{12}N_2O_5 \cdot 5 H_2O$.

ester. Durch Chromatographie an einer Chirasil-L-Val-Säule [26] konnte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen das L- bzw. D-Standards das bei der Ozonolyse erhaltene Produkt als L-Dab entsprechend der S-Konfiguration von **2** identifiziert werden.

(1S)-5-Amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolin-1-carbonsäure (1)

Der eigentliche Pyoverdin-Chromophor **1** konnte durch Hydrolyse der Pyoverdine C, D und E mit konz. HCl bei 37 °C über 21 Tage, nachfolgende Reinigung durch HPLC an Polygosil 60-C 18 und anschließend durch Chromatographie an CM-Celulose erhalten werden. **1** ist in konz. HCl bei Sauerstoffausschluß über mehrere Wochen stabil; in verd. HCl geht es in kurzer Zeit u. a. in **2** über.

Massenspektrometrie

Im EI-Spektrum sind die für **2** (s. o.) beschriebenen Ionen um jeweils 1u zu niedrigeren Werten verschoben (Ersatz von OH durch NH₂). Bei identischer Aufnahmetechnik sind die relativen Intensitäten der einander entsprechenden Ionen bei **1** und **2** etwa gleich. Die Elementarzusammensetzung von [M + H]⁺ (*m/z* 276) im FAB-Spektrum von **1** wurde durch exakte Massenmessung als C₁₃H₁₄N₃O₄ bestimmt.

NMR-Spektroskopie

Das ¹H-NMR-Spektrum von **1** ist in Tab. I aufgelistet. Die Zuordnung erfolgte wie bei **2**. Größere Unterschiede in der chemischen Verschiebung von **1** und **2** ergeben sich erwartungsgemäß nur bei H-6, H-7 und H-10 (in saurer Lösung liegt die NH₂-Gruppe von **1** protoniert vor und besitzt zum Unterschied von OH daher keinen +M-Effekt. Deprotonierung sollte zu einer Hochfeldverschiebung insbesondere von H-6 führen. Bei freiem **1** konnte dieses Experiment wegen der Hydrolyseempfindlichkeit nicht durchgeführt werden. Bei Derivaten von **1**, deren Carboxylgruppe amidisch an Aminosäuren gebunden ist, liegt bei pH 6,8 das H-6 Signal bei 7,19 ppm).

Die ¹³C-NMR-Daten von **1** finden sich in Tab. II zusammen mit den berechneten Werten für **4**. Mit Ausnahme der low-power heteronuklearen Einstrahlexperimente erfolgte die Zuordnung der einzelnen Signale wie bei **2**. Der deutlichste Unter-

schied in der chemischen Verschiebung von **1** und **2** ist wie erwartet bei C-5 (Bindungsstelle des OH bzw. NH₃⁺) festzustellen.

Experimenteller Teil

Massenspektren

Finnigan MAT HS-Q 30 (EI-Spektren und Stoßaktivierung), MAT 731 (FAB, Matrix Thioglycerin + DMF oder DMSO, Xe); Kratos MS 25 RF mit Carlo-Erba Gaschromatograph HRGC 5300 (GC/MS Untersuchungen).

NMR

Bruker AM 300 (300 MHz für ¹H, 75,5 MHz für ¹³C) Bruker, WM 300 (30,4 MHz für ¹⁵N); nähere Angaben zu den 2D-DEPT-COSY-Messungen in Ref. [9].

Gaschromatographie

Carlo-Erba HRGC 4160 mit FID-Detektor, N-Propyonyl-L-valin-*t*-butylamid an Polysiloxan (Chirasil-L-Val), Trägergas He.

Röntgenstrukturanalyse

Enraf-Nonius Einkristalldiffraktometer CAD-4. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur an einem Kristall, der sich in einem Kapillarröhrchen befand und mit einer gesättigten Lösung von **2** in 1N DCl/D₂O bedeckt war. Strukturdaten: C₁₃H₁₂N₂O₅·5H₂O; Molmasse 366,328 u; Raumgruppe P 1 (triklin); Gitterkonstanten *a* = 6,844, *b* = 10,594₂, *c* = 13,486₃ Å, α = 91,04₂°, β = 104,34₂°, γ = 96,62₂°; Zellbesetzung 2; ber. Dichte 1,294 g/cm³. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung an **2** können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, D-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-54208, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

*(1S)-5-Amino-2,3-dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolin-1-carbonsäure (1) und
(1S)-2,3-dihydro-5,8,9-trihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolin-1-carbonsäure (2)*

250 mg eines Gemisches der Pyoverdine C, D und E wurden 6 Tage mit 100 ml 2N HCl bei

110 °C (ergibt **2**) bzw. 3 Wochen mit 100 ml konz. HCl bei 37 °C (ergibt **1**) hydrolysiert. Die Lösungen wurden jeweils i.v. zur Trockene eingedampft. Die Abtrennung der Aminosäuren und Zersetzungsprodukte erfolgte durch präparative RP-HPLC an einer mit Polygosil 60-C18 (25–40 µ) gepackten Säule (Laufmittel CH₃OH/0,1% CF₃COOH in H₂O 1:5 v:v). **2** konnte auf diese Weise rein erhalten werden, **1** mußte nochmals an CM-Cellulose mit 0,1 M HCl chromatographiert werden. Ausbeute jeweils ca. 30 mg.

Ozonolyse

Zu der Apparatur (25 ml mit 3 ml Bodenkompartiment) wurden 2 ml trockenes CHCl₃ bei -25 °C mit trockenem O₃ (O₃-Generator Fa. Fischer, Meckenheim, 3 Vol-% O₃, 8 l/h Gas, Trocknung des O₂ über CaCl₂ und über Silicagel) gesättigt (1,5 h; Blaufärbung nach 0,5 h). Dieser Lösung wurden 80 mg **2** in 1 ml (CH₃)₂SO zugegeben. Es entstand eine bräunliche Suspension, die sich bei weiterem Einleiten von O₃ aufhellte. Nach 8 h wurde auf -5 °C aufgewärmt, 16 h stehen gelassen, wieder abgekühlt, erneut 8 h O₃ eingeleitet und in gleicher Weise nochmals verfahren (insgesamt 24 h Einleiten von O₃). Nach Aufwärmen auf Raumtemperatur und Lösen abgeschiedener farbloser Substanzen mit CH₃OH wurde die Gesamtlösung i.v. auf 5 ml eingeengt, mit einem Gemisch von 5 ml 30% H₂O₂, 15 ml reiner HCOOH sowie 2 Tropfen konz. H₂SO₄ versetzt, wobei sich das Gemisch auf 40 °C erwärmte. Während etwa 0,5 h klang die anfangs deutliche Gasentwicklung ab. Das Reaktionsgemisch wurde 0,5 h auf 60 °C er-

wärmt, i.v. auf 5 ml eingeengt, erneut mit 5 ml H₂O₂ versetzt, 5 h auf 90° erhitzt (Rückfluß) und 48 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abdestillieren des größten Teils der HCOOH i.v. wurde mit 10 ml H₂O (bidest.) versetzt und erneut eingeengt. Diese Operation wurde 5mal wiederholt, bis das Destillat neutral war. Das zur Trockene eingeengte Reaktionsprodukt wurde 24 h über CaCl₂ getrocknet.

Derivatisierung des hydrolysierten Ozonolysegemisches

Das trockene Hydrolysat wurde mit 2 ml Isopropanol versetzt, 1 ml der Lösung und 0,2 ml Acetylchlorid 1 h bei 110 °C belassen, nach dem Abkühlen zur Trockene gebracht, dreimal mit je 1 ml CH₂Cl₂ versetzt und erneut eingeengt, und der Rückstand i.v. getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml CH₂Cl₂ unter Ultraschalleinwirkung gelöst, mit 0,3 ml Trifluoracetanhydrid versetzt, 5 min auf 150 °C erhitzt, wieder zur Trockene eingeengt, dreimal in je 1 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und wieder eingeengt, 30 min i.v. getrocknet und erneut in 0,1 ml CH₂Cl₂ gelöst. Diese Lösung wurde für die GC- und GC/MS-Untersuchungen verwendet.

Dank

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir für finanzielle Unterstützung, Herrn Dr. Sauter (Fa. Ciba Geigy) für wertvolle Ratschläge bezüglich der NMR-Untersuchungen bestens danken.

- [1] Bakterieninhaltsstoffe IL; für Teil XLVIII s. K. Taraz, E. M. Schaffner, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **46c**, 194 (1991).
- [2] M. Teintze, M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong und D. v. d. Helm, *Biochemistry* **20**, 6446 (1981).
- [3] M. Teintze und J. Leong, *Biochemistry* **20**, 6457 (1981).
- [4] C.-C. Yang und J. Leong, *Biochemistry* **23**, 3534 (1984).
- [5] J. S. Buyer, J. M. Wright und J. Leong, *Biochemistry* **25**, 5492 (1986).
- [6] S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *Tetrahedron Lett.* **24**, 4877 (1983).
- [7] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **41c**, 497 (1986).
- [8] K. Poppe, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Tetrahedron* **43**, 2261 (1987).
- [9] G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 375.
- [10] M. Persmark, T. Frejd und B. Mattiasson, *Biochemistry* **29**, 7348 (1990).
- [11] K. Taraz, R. Tappe, H. Schröder, U. Hohlneicher, I. Gwose, H. Budzikiewicz, G. Mohn und J. F. Lefèvre, *Z. Naturforsch.* **46c**, 527 (1991).
- [12] T. Kolasa und M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **55**, 4246 (1990).
- [13] J. C. Mac Donald und G. G. Bishop, *Biochim. Biophys. Acta* **800**, 11 (1984).
- [14] D. H. Williams, A. F. Findeis, S. Naylor und B. W. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1980 (1987).
- [15] H.-O. Kalinowski, S. Berger und S. Braun, ¹³C-NMR-Spektroskopie, Thieme, Stuttgart 1984.
- [16] G. Briskot, Dissertation, Univ. Köln, 1988.
- [17] A. R. Katritzky, J. Ellison, J. Frank, P. Rakoczy, L. Radics und E. Gacs-Baitz, *Org. Magn. Reson.* **12**, 499 (1979).
- [18] P. E. Hansen, *Org. Magn. Reson.* **12**, 109 (1979).
- [19] W. v. Phillipsborn und R. Müller, *Angew. Chem.* **98**, 381 (1986).
- [20] M. Witkowski, L. Stefaniak und G. A. Webb, Nitrogen NMR Spectroscopy, in: Annual Reports of NMR Spectroscopy (G. A. Webb, hrsg.), Bd. 18, Academic, London 1986.
- [21] I. L. Karle und J. Karle, *Acta Cryst. B* **27**, 1891 (1971).
- [22] J. Corbin, I. L. Karle und J. Karle, *Chem. Commun.* **1970**, 186.
- [23] K. Taraz, D. Seinsche und H. Budzikiewicz, *Z. Naturforsch.* **46c**, 522 (1991).
- [24] L. Paulig, Die Natur der Chemischen Bindung, 3. Aufl., S. 422ff., Verlag Chemie, Weinheim 1973.
- [25] H. Boer, F. L. J. Sixma und J. P. Wibaut, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **70**, 509 (1951).
- [26] H. Frank, G. J. Nicholson und E. Bayer, *J. Chromatogr. Sci.* **15**, 174 (1977).