

Hans Jörg Lindner und Gerhard Schaden

## Pyrazolo[4.3-*e*]as-triazin, ein neues heterocyclisches System aus *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum*

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 20. Januar 1972)

*Pseudoiodinin* (1), das rote Pigment aus *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum*, spaltet sehr leicht eine Methylgruppe ab und geht in das gelbe Pigment Normethylpseudoiodinin über, das durch Röntgenstrukturanalyse als 3-Methoxy-1*H*-pyrazolo[4.3-*e*]as-triazin (2) identifiziert wurde. Mit Diazomethan kann aus dem gelben Pigment *Pseudoiodinin* zurückgebildet werden. Dabei erfolgt die Methylierung wahrscheinlich am N-2.

### Pyrazolo[4.3-*e*]as-triazine, a New Heterocyclic System from *Pseudomonas Fluorescens* Var. *Pseudoiodinum*

*Pseudoiodinine* (1), the red pigment isolated from *pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum*, loses easily one methyl group under formation of the yellow pigment normethylpseudoiodinine, which was identified by single crystal X-ray diffraction as 3-methoxy-1*H*-pyrazolo[4.3-*e*]as-triazine (2). Methylation of the yellow pigment with diazomethane leads to *pseudoiodintine*, probably by methylation at N-2.

Der von Korth in einem Trinkwasser aufgefundene Bakterienstamm *Pseudomonas fluorescens* var. *pseudoiodinum* bildet unter bestimmten Bedingungen ein tiefrotes als *Pseudoiodinin* (1) bezeichnetes Pigment<sup>1)</sup>. 1 läßt sich in wäßriger Lösung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zu einer Leukoverbindung reduzieren, die beim Entfernen des Schwefelwasserstoffs im Vakuum oder beim Durchleiten von Stickstoff wieder in die ursprüngliche Verbindung übergeführt wird<sup>2)</sup>. Ein ähnliches Redoxsystem liegt bei den von Kuhn aufgeklärten Pigmenten aus *Pseudomonas indigofera* vor<sup>3)</sup>.

1 hat die Summenformel C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O, das NMR-Spektrum zeigt bei  $\delta = 4.38$  und 4.58 ppm zwei Signale von Methylgruppen, außerdem ist noch ein Signal bei  $\delta = 9.26$  ppm entsprechend einem Wasserstoff zu erkennen. Beim Stehenlassen, besonders in Lösung, zersetzt sich 1 unter teilweiser Bildung einer gelben, beständigen Verbindung der Zusammensetzung C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O, die wir Normethylpseudoiodinin (2) nennen. 2 zeigt im IR-Spektrum eine OH- oder NH-Gruppe, tauscht im Massenspektrometer mit D<sub>2</sub>O ein Wasserstoffatom aus und bildet mit Acetanhydrid eine Acetylverbindung (3). Wegen der Schwerlöslichkeit von 2 war nur von 3 ein gutes NMR-Spektrum erhältlich, das neben der Acetylgruppe nur noch ein einer Methylgruppe entsprechendes Singulett bei  $\delta = 4.30$  ppm und ein einem Proton entsprechendes Singulett bei

<sup>1)</sup> H. Korth, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. Abt. I Orig. 215, 461 (1970); H. Korth, Arch. Mikrobiol. 77, 59 (1971).

<sup>2)</sup> A. Ritter, Privatmitteilung.

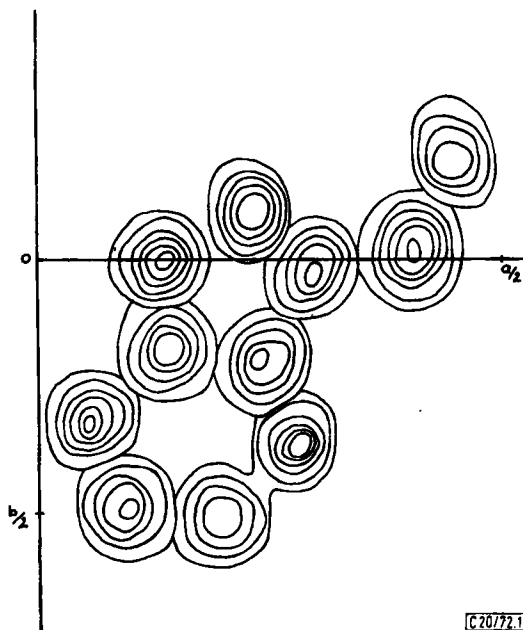
<sup>3)</sup> R. Kuhn, W. Blau, H. Bauer, H. J. Knackmuss, D. A. Kuhn und M. P. Starr, Naturwissenschaften 51, 194 (1964); 51, 409 (1964).

$\delta = 9.88$  ppm zeigt. Nach diesen Befunden muß **2** ein bicyclisches, Stickstoff enthaltendes Ringsystem mit einer OH- oder NH-Gruppe sowie einer *N*- oder *O*-Methylgruppe sein.

Auf Grund der verschiedenen Farben von **1** und **2** und der unterschiedlichen Stabilitäten war der Zusammenhang zwischen den beiden Verbindungen zunächst unklar. Die Methylierung von **2** mit Dimethylsulfat ergab ein Produkt mit der charakteristischen Farbe von **1**, ohne daß dieses jedoch isoliert werden konnte. Reaktion von **2** mit Diazomethan lieferte zwei Methylierungsprodukte; eines erwies sich identisch mit **1**, das zweite (**4**) ist isomer mit **1** und weist im UV-Spektrum nur geringe Änderungen gegenüber **2** auf. Wir nahmen daher an, daß in **4** die OH- oder NH-Gruppe von **2** methyliert worden war, da im NMR-Spektrum von **4** zwei Methylgruppen-Signale bei  $\delta = 4.20$  und  $4.24$  ppm auftreten und im IR-Spektrum die OH- oder NH-Bande fehlt. Die Farbänderung bei der Methylierung von **2** zu **1** blieb weiter ungeklärt.

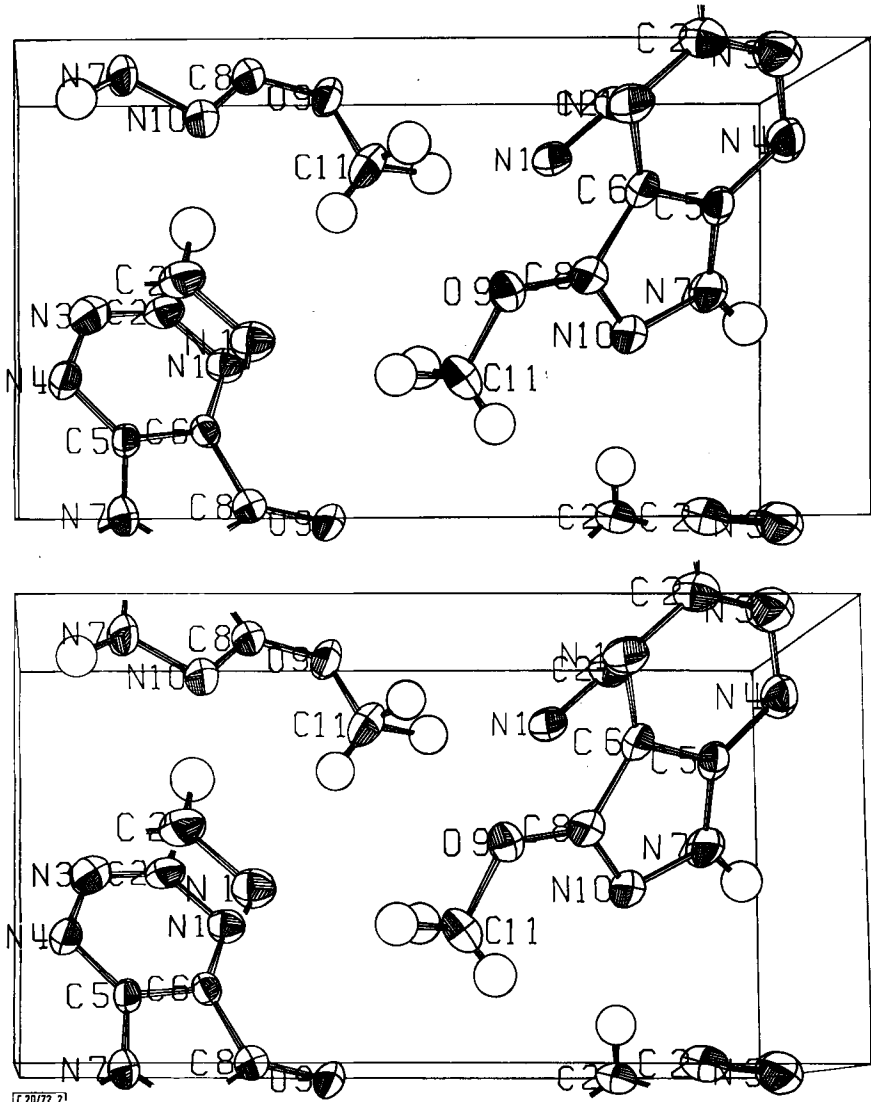
Reduktionen und Abbaureaktionen zur Strukturermittlung von **2** blieben erfolglos. Die Substanz erwies sich gegenüber den verschiedenen Agenzien stabil, oder es konnten, was auch durch die geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen bedingt war, keine definierten Reaktionsprodukte isoliert werden. **1** wandelte sich bei den Abbaubersuchen meist rasch in **2** um.

Da sich keine der Verbindungen in eine bekannte Naturstoffklasse einordnen ließ, wurde eine Röntgenstrukturanalyse von **2** vorgenommen. Die Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung am Einkristall führte zu der in Abbild. 1 gezeigten Elektronendichteverteilung bei einem konventionellen *R*-Faktor von 0.055. Der Inhalt der Elementarzelle ist in Abbild. 2 dargestellt.

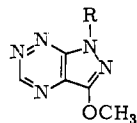
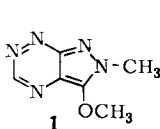


C 20772.1

Abbild. 1. Elektronendichteverteilung für **2**. Darstellung in der Projektion entlang der *c*-Achse, Konturlinien im Abstand von  $1.0 e/\text{\AA}^3$ , Basislinie  $0.5 e/\text{\AA}^2$



C 20772 2

Abbild. 2. Inhalt der Elementarzelle, stereoskopisch gezeichnet mit dem Programm ORTEP<sup>4)</sup>Demnach besitzen **2**, **3** und **4** die folgenden Strukturen:

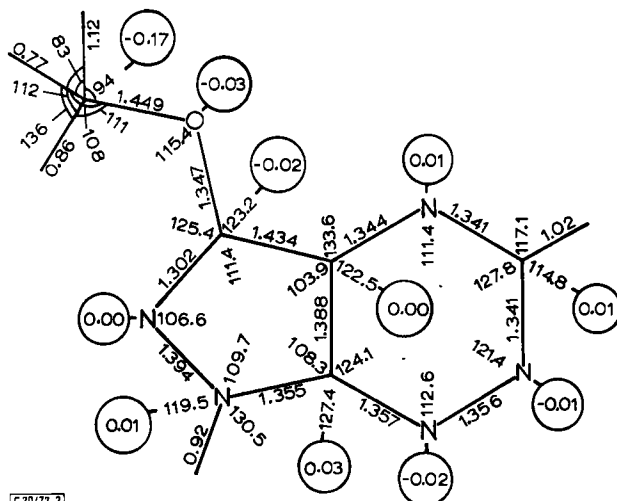
- 2:** R = H  
**3:** R = COCH<sub>3</sub>  
**4:** R = CH<sub>3</sub>

<sup>4)</sup> C. K. Johnson, ORTEP, a Fortran Thermal-Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations, ORNL-3794 (revised), 1965, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee.

**2** ist damit als 3-Methoxy-1*H*-pyrazolo[4.3-*e*]as-triazin identifiziert.

Die für **2** gefundenen Bindungslängen und -winkel sind in Abbild. 3 zusammen mit den Abweichungen der Atomlagen von der besten Ebene angegeben. Die Bindungslängen in dem ebenen Ringsystem liegen in dem für die Verbindung erwarteten Bereich. Die Ebene des Moleküls wird durch folgende Gleichung im direkten Kristallraum beschrieben:

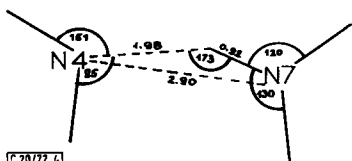
$$3.336X + 2.820Y + 3.345Z = 2.028$$



[C 20772.3]

Abbild. 3. Bindungslängen und -winkel sowie Abstände von der besten Molekülebene, Standardabweichung  $\sigma_{XX} = 0.009 \text{ \AA}$ ,  $\sigma_{XH} = 0.08 \text{ \AA}$ ,  $\sigma_{XXX} = 0.7^\circ$ ,  $\sigma_{XXH} = 4^\circ$ ,  $\sigma_{HXH} = 7^\circ$ ; X = C, N, O

Die Moleküle sind durch  $\text{NH} \cdots \text{N}$ -Wasserstoffbrücken zwischen den Atomen N-7 und N-4 verknüpft. Die geometrischen Verhältnisse der Wasserstoffbrücke sind in Abbild. 4 dargestellt. Der N-N-Abstand ist mit  $2.90 \text{ \AA}$  zwar länger als im Imidazol mit  $2.811 \text{ \AA}$ <sup>5)</sup>, liegt aber noch unter dem mittleren bei  $\text{NH} \cdots \text{N}$ -Wasserstoffbrücken gefundenen Abstand von  $3.00 \text{ \AA}$ <sup>6)</sup>.



[C 20772.4]

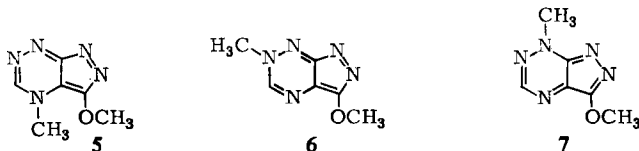
Abbild. 4. Abstände und Winkel der Wasserstoffbrücke

*Pseudoiodinin* (**1**) kann nach den experimentellen Befunden nur ein Methylierungsprodukt von **2** sein. Auf Grund der Lage der Methylgruppen-Signale im NMR-Spektrum ist es unwahrscheinlich, daß **1** ein C-Methylierungsprodukt von **2** ist. Auch

<sup>5)</sup> G. Will, Z. Kristallogr., Kristallgeometr., Kristallphysik, Kristallchem. **129**, 211 (1969).

<sup>6)</sup> G. C. Pimentel und A. L. Mc Clellan, The Hydrogen Bond, San Francisco, S. 283, 1960.

die leichte Abspaltbarkeit der Methylgruppe spricht gegen eine C-Methylierung. **1** ist demnach wie das Hauptprodukt **4** der Methylierung von **2** ein *N*-Methylierungsprodukt. Von den *N*-Methylierungsprodukten von **2** (**1**, **4**, **5**, **6** und **7**) enthält nur **1** ein *o*-chinoides System, das die tiefe Farbe von **1** sowie die leichte, reversible Reduktion zur Leukoverbindung erklärt.



Berechnung der Atomisierungsenergien mit der semiempirischen SCF-LCAO-MO-Methode von Dewar und Morita<sup>7)</sup> ergab ohne Berücksichtigung der *N*-Methylgruppen folgende Werte:

<b>1</b>	72.81 eV	<b>6</b>	71.76 eV
<b>4</b>	72.87 eV	<b>7</b>	71.89 eV
<b>5</b>	71.46 eV		

Das Produkt mit der höchsten Atomisierungsenergie ist die bei der Methylierung als Hauptprodukt entstehende Verbindung **4**. Die einzige Verbindung mit vergleichbarer Atomisierungsenergie ist **1**. Methylierung am Triazinring erscheint danach als äußerst ungünstig.

Die angegebene Struktur **1** für Pseudoiodinin erscheint auf Grund der gesamten Ergebnisse als wahrscheinlich.

## Beschreibung der Versuche

**Reindarstellung von Pseudoiodinin (1) und Normethylpseudoiodinin (2):** Das nach l. c.<sup>1)</sup> isolierte Produkt wird, da es meist beim Stehenlassen etwas **2** gebildet hat, in Chloroform gelöst und an Kieselgel 0.2–0.5 mm (Merck) mit Chloroform/Aceton chromatographiert. **1** erhält man in schwarzen Kristallen (Schmp. 112°), **2** als gelbe Kristalle. Durch Sublimation von **2** i. Hochvak. und Kristallisation aus Methanol bei Raumtemperatur erhält man die für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Einkristalle vom Schmp. 196°.

**Spektren von 1:** MS: 165.0652 (ber. für C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O 165.0651), 95.0250 (ber. für C<sub>4</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O 95.0245), 67.0298 (ber. für C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> 67.0296), kein Austausch beim Einlaß von D<sub>2</sub>O; NMR (in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ = 4.38 ppm (s, 3H), δ = 4.58 ppm (s, 3H), δ = 9.26 ppm (s, 1H); UV (in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 536, 374, 295, 254 nm.

C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O (165.1) Ber. C 43.63 H 4.27 Gef. C 42.85 H 4.15

**Spektren von 2:** MS: 151.0486 (ber. für C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O 151.0494), 123.0431 (ber. für C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O 123.0433), Austausch von einem H beim Einlaß von D<sub>2</sub>O; IR (in KBr): 3100/cm; UV (in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 402, 360, 287, 281, 277, 231 nm.

C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O (151.1) Ber. C 39.73 H 3.33 N 46.34 Gef. C 40.00 H 3.41 N 46.63

**Acetylderivat von 2 (3):** 20 mg (0.13 mMol) **2** werden mit 4 g (39 mMol) Acetanhydrid eine Stde. auf 90° erhitzt, das überschüss. Acetanhydrid wird unter Zusatz von Methanol i. Vak. abgezogen. Wenn die Ausgangsprodukte sehr rein sind, kann die so gebildete Acetylverbindung

<sup>7)</sup> M. J. S. Dewar und T. Morita, J. Amer. chem. Soc. **91**, 796 (1969).

(3) (15 mg, 0.078 mMol) unzersetzt i. Hochvak. sublimiert und an Kieselgel chromatographiert werden (gelbe Krist., Schmp. 147°).

$C_7H_7N_5O_2$  (193.2) Ber. C 43.52 H 4.27 Gef. C 43.91 H 3.72

MS: 193, 151, 123, 43; UV (in  $CH_2Cl_2$ ): 340, 272, 247 nm; NMR (in  $CDCl_3$ ):  $\delta = 2.90$  ppm ( $CH_3CO$ ), 4.30 ppm (s, 3H), 9.88 ppm (s, 1H); IR: 1960/cm.

**Methylierung von 2 zu 4 (Hauptprodukt) und 1 (Nebenprodukt):** 40 mg (0.26 mMol) 2 werden mit dest. Diazomethan (aus 5 g = 49 mMol Nitrosomethylharnstoff) in Äther versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Kristalle lösen sich dabei auf und es entsteht eine dunkle Lösung. Das überschüss. Diazomethan und der Äther werden i. Vak. abgedampft und das Produkt an Kieselgel 0.2–0.5 mm mit Chloroform/Aceton chromatographiert. Als Hauptprodukt (22 mg, 0.13 mMol) erhält man 4 in gelben Kristallen vom Schmp. 149°, daneben 1 (5 mg, 0.03 mMol), das durch MS, UV, NMR und Dünnschichtchromatographie als identisch mit dem Naturprodukt erkannt wurde.

4:  $C_6H_7N_5O$  (165.1) Ber. C 43.63 H 4.27 N 42.41 Gef. C 43.51 H 4.31 N 40.87

MS: 165, 137, 122; NMR (in  $CDCl_3$ ):  $\delta = 4.22$  ppm (s, 3H), 4.26 ppm (s, 3H), 9.72 ppm (s, 1H); UV (in  $CH_2Cl_2$ ): 410, 386, 291, 285, 280, 275, 234 nm.

### Röntgenstrukturanalyse

**Gitterkonstanten:** Monoklin,  $a = 12.24 \pm 0.01$  Å,  $b = 6.78 \pm 0.005$  Å,  $c = 3.88 \pm 0.005$  Å,  $\beta = 91.10^\circ$ ,  $V_{EZ} = 321.8$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $D_{ber} = 1.560$  g/cm<sup>3</sup>,  $D_{beob} = 1.57 \pm 0.01$  g/cm<sup>3</sup>.

**Raumgruppe:**  $P2_1$ .

**Intensitätsmessung:** 568 Reflexe der Schichten  $hk0 \cdot \cdot 3$  wurden mit monochromatisierter  $CuK\alpha$ -Strahlung mit einem automatischen Weissenberg-Diffraktometer gemessen. 548 Reflexe mit beobachteten Intensitäten ( $I > 2\sigma$ ) wurden zur Strukturbestimmung verwendet.

**Strukturaufklärung und Verfeinerung:** Die Struktur wurde mit Hilfe der symbolischen Additionsmethode von Karle und Karle<sup>8)</sup> unter Verwendung eines Phasenbestimmungsprogramms nach Germain und Woolfson<sup>9)</sup> aufgeklärt. Die Unterscheidung zwischen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatomen war aus der  $E$ -Wert-Fouriersynthese nicht möglich. Das Modell wurde durch LSQ-Rechnungen<sup>10)</sup> isotrop von  $R = 0.213$  bis  $R = 0.155$  verfeinert, wobei alle Atome als Kohlenstoffatome behandelt wurden. Eine anschließende Fouriersynthese zeigte, daß Atom 11 das Kohlenstoffatom einer Methylgruppe und Atom 9 mit der höchsten Elektronendichte das Sauerstoffatom waren. Außerdem waren nach der Elektronendichtefunktion die Atome 1, 3, 4, 7 und 10 als Stickstoffatome anzunehmen. Nach weiterer anisotroper Verfeinerung auf  $R = 0.071$  konnten in einer Differenz-Fouriersynthese die Wasserstoffatome der Methylgruppe und die beiden Wasserstoffe des Ringsystems an den Atomen 2 und 7 lokalisiert werden. Damit waren die Atome 1, 3, 4 und 10 als Stickstoffatome gesichert. Durch die Existenz der Wasserstoffbrücke Atom 7—H $\cdot\cdot\cdot$ N4 war auch Atom 7 als Stickstoffatom sehr wahrscheinlich. Die anisotrope Verfeinerung dieses Modells, wobei die Wasserstoffatome die Temperaturfaktoren der zugehörigen Atome erhielten, führte zu einem  $R$ -Faktor von 0.055. In der anschließenden Differenz-Fouriersynthese waren keine Elektronendichten außerhalb des Bereichs  $\pm 0.01$  e/Å<sup>3</sup> zu finden. Alle Rechnungen wurden mit den in den Internationalen Tabellen<sup>11)</sup> angegebenen Atomformfaktoren durchgeführt. Die gefundenen Atomparameter sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

<sup>8)</sup> J. Karle und I. L. Karle, Acta crystallogr. [Copenhagen] **21**, 849 (1966).

<sup>9)</sup> G. Germain und M. M. Woolfson, Acta Crystallogr. [Copenhagen] **B24**, 21 (1968).

<sup>10)</sup> W. R. Busing, K. O. Martin und H. A. Levy, ORFLS, a Fortran Crystallographic Least Squares Program, ORNL-TM-305, Oak Ridge, Tennessee, 1962.

<sup>11)</sup> International Tables for X-Ray Crystallography, Vol III, S. 202, The Kynoch Press, Birmingham 1962.

Tab. 1. Atomparameter  
 a) Ortskoordinaten

Atom	X	Y	Z
N(1)	0.2780(4)	0.3674(0)	0.0167(10)
C(2)	0.1967(5)	0.4992(13)	-0.0128(15)
N(3)	0.0949(4)	0.4840(12)	0.1058(11)
N(4)	0.0618(4)	0.3218(11)	0.2797(11)
C(5)	0.1407(4)	0.1817(10)	0.3048(12)
C(6)	0.2463(4)	0.2056(10)	0.1879(12)
N(7)	0.1345(3)	0.0046(11)	0.4650(11)
C(8)	0.3006(4)	0.0269(11)	0.2899(12)
O(9)	0.5942(3)	0.4885(10)	0.7809(9)
N(10)	0.7651(4)	0.4084(10)	0.5506(11)
C(11)	0.5504(5)	0.3087(13)	0.6313(16)
H(12)	0.790 (5)	0.119 (12)	0.164 (15)
H(17)	0.924 (5)	0.441 (11)	0.441 (14)
H(111)	0.592 (6)	0.210 (13)	0.679 (16)
H(211)	0.510 (6)	0.338 (13)	0.484 (18)
H(311)	0.475 (5)	0.310 (14)	0.790 (16)

## b) Anisotrope Temperaturfaktoren in der Form

$$T = \exp -(\beta_{11}h^2 + \beta_{22}k^2 + \beta_{33}l^2 + 2\beta_{12}hk + 2\beta_{13}hl + 2\beta_{23}kl)$$

Atom	$\beta_{11}$	$\beta_{22}$	$\beta_{33}$	$\beta_{12}$	$\beta_{13}$	$\beta_{23}$
N(1)	0.0051(3)	0.0139(12)	0.0447(29)	-0.0004(5)	0.0014(7)	0.0017(14)
C(2)	0.0064(5)	0.0121(12)	0.0827(46)	0.0010(7)	-0.0043(10)	0.0016(24)
N(3)	0.0060(4)	0.0171(12)	0.0569(35)	0.0013(6)	-0.0005(8)	-0.0012(17)
N(4)	0.0036(3)	0.0165(12)	0.0702(34)	0.0012(5)	-0.0018(7)	-0.0067(17)
C(5)	0.0026(3)	0.0135(12)	0.0466(35)	0.0002(5)	-0.0010(7)	-0.0050(16)
C(6)	0.0030(3)	0.0123(12)	0.0367(36)	-0.0008(5)	-0.0004(7)	-0.0019(14)
N(7)	0.0030(3)	0.0170(11)	0.0666(33)	-0.0007(5)	0.0035(7)	0.0015(18)
C(8)	0.0038(3)	0.0132(13)	0.0346(31)	-0.0002(5)	0.0004(7)	-0.0005(16)
O(9)	0.0033(2)	0.0157(9)	0.0798(30)	-0.0013(4)	0.0008(6)	-0.0032(16)
N(10)	0.0039(3)	0.0144(11)	0.0652(31)	0.0002(5)	-0.0006(7)	-0.0008(16)
C(11)	0.0048(4)	0.0198(15)	0.0885(48)	-0.0035(7)	-0.0022(10)	-0.0025(24)

Die experimentellen Arbeiten zur Röntgenstrukturanalyse wurden im Eduard-Zintl-Institut, Lehrstuhl für Strukturforchung der Technischen Hochschule Darmstadt, die Rechnungen im Rechenzentrum der Technischen Hochschule Darmstadt und im Deutschen Rechenzentrum Darmstadt durchgeführt.

Wir danken den Herren Dr. H. Korth, Köln, und Dr. A. Ritter, Mülheim-Ruhr, für die Überlassung des Arbeitsgebietes und des Pseudoiodinins, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für finanzielle Unterstützung und Fräulein B. von Gross für ihre Mitarbeit bei der Strukturanalyse.