

BIOSYNTHESE VON PYRROLNITRIN -
NACHWEIS VON 4-(2'-AMINO-3'-CHLORPHENYL)PYRROL-2-CARBONSÄURE

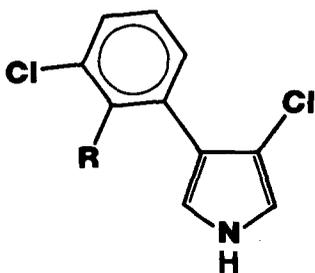
Olga Salcher und Franz Lingens *

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim
Garbenstraße 30, D-7000 Stuttgart 70 (Deutschland)

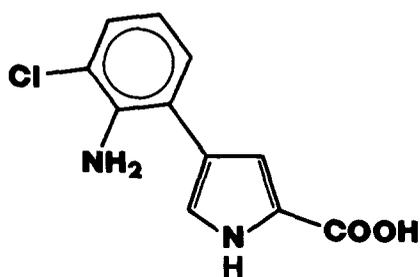
Peter Fischer

Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung
Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart 80 (Deutschland)

In den letzten Jahren konnten mehrere Phenylpyrrol-Derivate aus Gram-negativen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* isoliert und charakterisiert werden, darunter Pyrrolnitrin [3-Chlor-4-(2'-nitro-3'-chlorphenyl)pyrrol, **1**] sowie dessen direkter Vorläufer in der Biosynthesekette, Aminopyrrolnitrin [3-Chlor-4-(2'-amino-3'-chlorphenyl)pyrrol, **2**]¹. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Isolierung und Charakterisierung eines bislang nicht beschriebenen Phenylpyrrol-Derivats, 4-(2'-Amino-3'-chlorphenyl)pyrrol-2-carbonsäure (**3**), aus einem Stamm von *Pseudomonas aureofaciens*. Dieses Bakterium bildet außerdem Aminopyrrolnitrin und Pyrrolnitrin.



R = NO₂ Pyrrolnitrin **1**
R = NH₂ Aminopyrrolnitrin **2**



Metabolit **3**

Pseudomonas aureofaciens, Stamm G 16, wurde in Glycerin-Minimalmedium mit einem Zusatz von $3 \times 10^{-3} M$ D-Tryptophan gezüchtet. Die Fermentation wurde jeweils abgebrochen, sobald sich in den Kulturen Aminopyrrolnitrin nachweisen ließ, und das zellfreie Medium bei pH 5.5 mit Essigester extrahiert. Nach dem Einengen im Vakuum wurde der Extrakt an Kieselgel 60 chromatographiert, wobei

zuerst mit Benzol - zur Abtrennung von Pyrrolnitrin und Aminopyrrolnitrin - eluiert wurde. Zur Elution des Metaboliten wurde ein Gemisch Essigester/Isoopropanol/Wasser (65:24:11) verwendet. Durch Chromatographie an Sephadex LH 20 (Isopropanol bzw. Methanol/H₂O, 6:4) wurde die Verbindung weiter gereinigt; nach Umkristallisation aus Methanol/H₂O zeigte sie einen Schmelzpunkt von 198°C (Zers.).

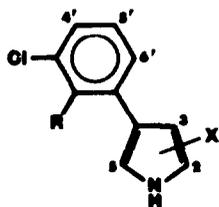
Im Massenspektrum des isolierten Metaboliten erscheint das Molekülion als Dublett bei m/e 236/238 (3:1) (Tab. 2); das Metabolitmolekül enthält demnach ein Chlor sowie eine gerade Zahl von N-Atomen. Das hochaufgelöste MS ergibt eine exakte Mol.-Masse von 236.0352₂, die einer Summenformel C₁₁H₉ClN₂O₂ entspricht (ber. 236.0352₄).

Das ¹H-NMR-Spektrum des Metaboliten **3** (in CD₃OD) zeigt lediglich Signale im Aromatenbereich. Neben komplex strukturierten Resonanzen im Bereich 6.97 - 7.27 ppm erscheinen drei Linien bei etwas höherem Feld. Sie sind äquidistant ($\Delta\delta$ 7.7 Hz) und intensitätsmäßig in Richtung auf die Resonanzen bei tieferem Feld polarisiert; die innere Linie weist zudem eine geringfügige Aufspaltung auf. Dies deutet klar auf ein Arylproton hin, das mit zwei weiteren, ortho-ständigen H-Atomen koppelt und relativ zu diesen durch den +M-Effekt eines para-Substituenten hochfeldverschoben ist. Während die "Triplet"-Aufspaltung Protonen in o- und o'-Stellung erfordert, müssen beide meta-Positionen von Substituenten besetzt sein, da das Triplet keinerlei zusätzliche Aufspaltung durch ⁴J-Kopplungen erkennen läßt. Der Vergleich mit dem 5'-Proton im 3-Chlor-4-(2'-amino-3'-chlorphenyl)pyrrol **2** erweist klar das identische Substitutionsmuster im Phenylkern des Metaboliten.

Zur endgültigen Bestätigung haben wir die ABM- bzw. ABC-Partialspektren der drei Phenylprotonen 4',5',6'-H von **1**, **2** und **3** einer numerischen Analyse unterzogen. Bei **2** ist die Kopplung zwischen 4'- und 6'-H so locker, daß die exakten Werte (Tab. 1) nur wenig von denen einer first order-Analyse differieren. Bei **3** dagegen erlaubt erst die numerische Auswertung eine Zuordnung der 4',6'-H-Resonanzen zu einzelnen Signalen in dem komplexen Liniennmuster zwischen 7.0 und 7.3 ppm, wobei dann allerdings hervorragende Übereinstimmung zwischen experimentellem und simuliertem Spektrum erzielt wird.

Die völlige Identität der drei Kopplungskonstanten (J_{ortho} , $J_{ortho'}$, J_{meta} , s. Tab. 1), aber auch die praktisch identische Verschiebung von 4'- und 5'-H für den Metaboliten und die Modellverbindung **2** sind beweisend für das Vorliegen der 2-Amino-3-chlorphenyl-Teilstruktur beim Metaboliten. Da das typische AB-Spektralmuster der Pyrrolnitrine (s. Tab. 1) im ¹H-Spektrum von **3** fehlt, ist 3,4-Disubstitution im Pyrrolring des Metaboliten auszuschließen; eine weitere Analyse anhand des NMR-Spektrums ist vorläufig nicht möglich.

Tabella 1. $^1\text{H-NMR}$ -Daten (δ_{TMS} [ppm], J [Hz])^a verschiedener 4-Phenylpyrrole (in CD_3OD bzw. CDCl_3 , 30°C)



R X	1 ^b		2 ^b		3 ^c
	NO ₂ Cl		NH ₂ Cl		NH ₂ COOH
	CD ₃ OD / CDCl ₃		CD ₃ OD / CDCl ₃		
4'-H	/	7.524 ^e	7.159 / 7.237		7.128
5'-H	7.523 ^d /	7.447	6.655 / 6.712		6.664
6'-H	/	7.435 ^e	7.015 / 7.087		7.090
2-H	6.839 /	6.834	6.849 / 6.841		
3-H	- /	-	- / -		
5-H	6.748 /	6.817	6.799 / 6.878		
1-NH	? /	~ 8.5	? /	~ 8.1	
³ J(4'-H, 5'-H)	- /	7.92 ^e	7.98 / 7.97		7.97
³ J(5'-H, 6'-H)	- /	8.13 ^e	7.59 / 7.60		7.63
⁴ J(4'-H, 6'-H)	- /	1.21	1.48 / 1.49		1.48
⁴ J(2-H, 5-H)	2.29 /	2.34	2.28 / 2.36		?
³ J(2,5-H, NH)	- /	2.84, 3.26	- / 2.87, 3.02		?

^a Aufgenommen in Puls-Fourier-Transform-Technik auf einem Bruker HX 90 E mit Nicolet BNC-12/20k-Computer; spektrale Breite 892.8571 Hz (entsprechend einer digitalen Auflösung von 0.11 Hz bzw. einer spektralen Genauigkeit von ± 0.05 Hz).

^b 2.5×10^{-2} molar in CD_3OD bzw. CDCl_3 .

^c 200 μg in 0.5 ml CD_3OD (2×10^{-3} molar); akkumuliert wurden 17000 scans, so daß sich auch ohne exponentielle Glättung ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis, bei gleichzeitig hoher Auflösung, erzielen ließ.

^d Alle Resonanzen zu einem scharfen Singulett entartet.

^e Zuordnung austauschbar.

Aus der (durch hochaufgelöste MS ermittelten) Summenformel geht hervor, daß das Molekül 8 Doppelbindungsäquivalente besitzen muß. Diese Forderung ist mit dem Strukturvorschlag 4-(2'-Amino-3'-chlorphenyl)pyrrol-2-carbonsäure erfüllt. Das massenspektrometrische Fragmentierungsmuster des Metaboliten (Tab. 2) wird durch die für eine Pyrrolcarbonsäure charakteristische Abspaltung von H_2O bzw. CO_2 bestimmt. Daneben zeigt das Molekül den üblichen Verlust von HCN und HCl sowie von $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}$ (m/e 190/192, s. Tab. 2).

Tabelle 2. Massenspektrum (70 eV, 135° C) des Metaboliten **3**.

m/e	Intensität (% base peak)	
236/238	79/26	M ⁺
218/220	100/33	M - H ₂ O
192/194	19/ 6	M - CO ₂
190/192	11/	M - H ₂ O, CO
189/191	29/	M - H ₂ O, HCN
164/166	41/12	M - CO ₂ , H, HCN
155	50	M - CO ₂ , H, HCl

Die längstwellige Bande im UV-Spektrum des Metaboliten **3** zeigt - ebenso wie die entsprechende Absorption des Aminopyrrolnitrins **2** - beim Wechsel von neutralem in saures Medium stark hypsochrome Verschiebung.

	MeOH	MeOH / 0.1 n NaOH	MeOH / 0.1 n HCl
λ_{\max} [nm] (ϵ)	302 (3000)	304 (4750)	270 (7200)
	221 (16800)	265 (7250) 217 (21200)	217 (10400)

Die von uns aufgrund der spektralen Befunde für den Metaboliten vorgeschlagene Struktur, 4-(2'-Amino-3'-chlorphenyl)pyrrol-2-carbonsäure (**3**), wird als Zwischenprodukt der Pyrrolnitrin-Biosynthese postuliert; dabei entstünde aus **3** nach Chlorierung in 3-Stellung des Pyrrolrings und anschließender Decarboxylierung Aminopyrrolnitrin. Enzymatische Versuche könnten zur Klärung dieses Problems beitragen. Als direkter Vorläufer von **3** in der Biosynthesekette kommt ein in 7-Stellung chloriertes Tryptophan in Frage.

Wir danken Herrn Dr. Wolfram Schäfer, Martinsried, für die Aufnahme des hochaufgelösten Massenspektrums und dem Fonds der Chemischen Industrie für Unterstützung dieser Arbeit.

(Received in Germany 29 May 1978; received in UK for publication 23 June 1978)

REFERENCES

1. M.Gorman und D.H.Lively, *Antibiotics II*, Herausg. D.Gottlieb und P.D.Shaw, S. 433-438, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1967).