

61. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

232. Mitteilung¹⁾**(E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propensäure und (E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propensäureamid aus *Streptomyces parvulus*, Stamm Tü 2480**

von Walter Keller-Schierlein*, André Müller und Leonhard Hagmann

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8092 Zürich

und Ursula Schneider und Hans Zähler

Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen

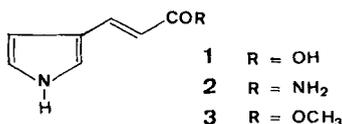
(6.II.85)

(E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propenoic Acid and (E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propenamide from *Streptomyces parvulus*, Strain Tü 2480

The title compounds were isolated from cultures of *Streptomyces parvulus*. They give a deep blue colour reaction with *Ehrlich* reagent. Their structures were elucidated by spectroscopy and comparison with synthetic samples. They do not show any antimicrobial activity.

Extrakte aus Kulturen des Actinomycetenstammes Tü 2480, der auf Grund seiner diagnostischen Eigenschaften der Spezies *Streptomyces parvulus* WAKSMANN et GREGORY zugeordnet wird, enthielten zwei Substanzen, die auf DC-Platten mit *Ehrlich*-Reagens eine tiefblaue Farbreaktion zeigten. Durch Chromatographie liessen sich die beiden Verbindungen nur unvollständig trennen, da die Komponente mit höherem R_f -Wert, eine Säure, aus Kieselgel sehr schleppend eluiert wurde. Dagegen konnte die Säure aus einer AcOEt-Lösung mit NaHCO_3 ausgezogen werden, während die Verbindung mit kleinerem R_f -Wert in den Neutralteilen blieb. Nach der chromatographischen Reinigung wurden beide Verbindungen in kristallisierter Form erhalten.

Die Säure **1**, farblose Kristalle mit Schmp. 180–182°, entsprach gemäss Elementaranalyse einer Zusammensetzung $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$, die durch das MS (M^+ : m/z 137) und das durch Mikrotitration bestimmte Äquivalentgewicht (gef.: 143) gesichert wird. Das Vorliegen einer Carboxylgruppe ergab sich aus der potentiometrischen Titration ($\text{p}K'_{\text{MCS}}$ 7,60) und der Bildung des kristallinen Methylesters **3** mit CH_2N_2 . Das UV mit einem breiten Maximum bei 300 nm weist auf einen ausgedehnten Chromophor hin. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigt neben einem Carboxyl-Signal (11,75 ppm) und einem breiten Signal für

¹⁾ 231. Mitteilung: [1].

ein NH (11,12 ppm) ausschliesslich Signale im Bereich aromatischer und olefinischer Protonen, nämlich 2 Dublette ($J = 15,5$) bei 5,96 und 7,48 ppm für Protonen an einer (*E*)-disubstituierten Doppelbindung und 3 schmale Multiplette mit nur kleinen Kopplungskonstanten bei 6,36, 6,76 und 7,14 ppm. Dieses Spektrum in Verbindung mit der Elementarzusammensetzung ist nur mit der Struktur einer 3-Pyrrylacrylsäure verträglich. Das vom Methylester **3** aufgenommene ^{13}C -NMR deutet ebenfalls auf eine derartige Struktur hin.

Nicht abgeschlossene synthetische Versuche zeigten bald, dass es sich nicht um die zunächst vermutete (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-2-yl)-2-propensäure handeln konnte. Die isomere (*E*)-3-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-2-propensäure (**1**) ist als Naturstoff unseres Wissens bisher unbekannt, doch ist sie kürzlich von *Labouta et al.* [2] synthetisch hergestellt worden. Ein in ähnlicher Weise ausgehend von 1-Äthoxycarbonyl-3-formylpyrrol [3] hergestelltes Vergleichspräparat von **1** stimmte nach DC, Farbreaktion und Spektren mit der Säure aus dem *Streptomyces*-Stamm Tü 2480 überein.

Das neutrale Stoffwechselprodukt **2**, farblose Kristalle mit Schmp. 141–142°, besitzt die Bruttoformel $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ (Anal., MS). Das UV ist sehr ähnlich demjenigen von **1**. Es handelt sich offenbar um das Amid von **1**, womit auch das ^1H -NMR vereinbar ist. Ein Vergleichspräparat, das aus synthetischem **1** über das Säurechlorid bereitet wurde, stimmte nach DC, IR und ^1H -NMR mit natürlichem **2** überein.

Die Verbindungen **1** und **2** zeigten keine Wirkung gegen Gram-pos. und Gram-neg. Bakterien, Hefen und Pilze. Auch andersartige biologische Aktivitäten konnten bisher nicht aufgefunden werden. Während in Stellung 2 substituierte Pyrrole bei Mikroorganismen recht oft aufgefunden werden²⁾, sind in Stellung 3 monosubstituierte Pyrrole als Naturstoffe sehr selten³⁾.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [6]. *Ehrlich*-Sprühreagens: 1 g 4-(Dimethylamino)benzaldehyd in 10 ml konz. HCl/MeOH 1:3.

Beschreibung des Actinomycetenstammes. Der Stamm Tü 2480 wurde aus einer Erdprobe aus Phacet (Süd-Thailand) isoliert. Luftmycel anfangs kreideweiss, später aschgrau (*cinereus*). Sporen ellipsoid, etwa 1–1,4 μm lang, 0,7–1 μm breit mit glatter Oberfläche. Sporenketten monopodial verzweigt mit unregelmässigen Spiralen. Keine Melaninbildung auf Pepton-Eisen-Agar. Aufgrund dieser Eigenschaften gehört der Stamm gemäss der Systematik von *Hütter* [7] zur Art *Streptomyces parvulus* WAKSMAN et GREGORY.

Fermentierung. *Erlenmeyer*-Kolben à 500 ml mit seitlichem Einstich und je 100 ml Nährlg. (2% Sojamehl, 2% Mannit, pH 7,5) wurden aus Schrägagar-Kulturen beimpft und auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) bei 27° inkubiert. Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (Modell *F-14*, *New Brunswick Scientific Co.*) wurden mit 9 l Nährlg. beschickt und 30 min bei 134° sterilisiert. Als Impfmateriale diente der Inhalt von 10 24 h alten *Erlenmeyer*-Kulturen (s. oben). Blattrührer mit 240 U/min, Belüftung mit 4 l steriler Luft pro min, Schaumbekämpfung mit sterilem Polyol. Inkubationsdauer 96 h, bei 27° bis zur Ernte oder 24 h bis zur Überimpfung auf den 100-l-Fermenter. Fermentation im 100-l-Fermenter (Modell *F-130*, *New Brunswick Scientific Co.*) mit 90 l Nährlg., die 30 min bei 121° sterilisiert worden war. Rührer mit 200 U/min, 40 l steriler Luft pro min, Schaumbekämpfung mit Polyol in EtOH und mit Siliconöl, Dauer 96 h bei 27°.

Isolierung der Stoffwechselprodukte. Nach Zusatz von 2% *Celite* wurde die Kultur mit einer Mehrschichten-Filterpresse (Filterschicht *C 150*, *Schenk Filterbau*, Schwäbisch Gmünd) geklärt und das Filtrat auf eine Säule mit 5 kg *Amberlite XAD-4* gegeben. Nach dem Waschen mit H_2O wurde mit MeOH eluiert und das Lsgm. i. V. eingedampft. Der Filterkuchen wurde mit MeOH extrahiert und der wässr. Rückstand nach dem Eindampfen

²⁾ Pyrrol-2-carbonsäure und mehrere Antibiotica, die diese als biogenetischen Baustein enthalten [4].

³⁾ Pyrrolnitrin und verwandte Antibiotica aus Bakterien der Gattung *Pseudomonas* [5] mit zusätzlichen Halogensubstituenten am Pyrrolring.

gleich behandelt wie das Kulturfiltrat. Aus 2 100-l-Fermentern wurden 90 g Rohkonzentrat als braunes Öl erhalten. Dieses wurde mit 0,1 l MeOH und 2 l AcOEt aufgeschlämmt, filtriert und der Festkörper nach dem Filtrieren noch 3mal mit je 0,4 l AcOEt ausgezogen. Die vereinigten Filtrate gaben beim Eindampfen 7,5 g zähes Öl, das in 1,5 l AcOEt gelöst und 4mal mit je 0,5 l ges. NaHCO₃-Lsg. ausgeschüttelt wurde. Die NaHCO₃-Auszüge wurden mit verd. HCl auf pH 3 angesäuert und 4mal mit AcOEt ausgezogen. Die rohen Säuren (2,7 g Eindampfrückstand) wurden an 500 g Kieselgel chromatographiert (CHCl₃/MeOH 9:1). Nach erneuter Chromatographie an *Sephadex LH-20* (2,5 × 70 cm, MeOH) und Umkristallisieren aus AcOEt wurden 306 mg Säure **1** als farblose Kristalle erhalten. Die neutralen Produkte (3,5 g) wurden mit AcOEt/CHCl₃/MeOH 20:16:3 an 550 g Kieselgel und anschliessend mit MeOH an *Sephadex LH-20* chromatographiert. Die Fraktionen mit blauer *Ehrlich*-Reaktion gaben nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus AcOEt 435 mg Säureamid **2** als farblose Kristalle. Der in AcOEt unlösliche Filtrerrückstand der Rohkonzentrate wurde mehrmals mit MeOH ausgezogen und filtriert. Das Filtrat gab 43,5 g Eindampfrückstand, der u. a. Pyridindolol [8] und mehrere damit verwandte Alkaloide enthielt, worüber in einer späteren Abhandlung berichtet werden soll.

Sämtliche Operationen wurden mittels DC und Besprühen mit *Ehrlich*-Reagens verfolgt. Laufmittel AcOEt/MeOH/H₂O 30:4:3. Säure **1**: R_f 0,57, Amid **2**: R_f 0,33; tief indigoblaue Flecke.

(E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propensäure (**1**). Schmp. 180–182°. UV (EtOH): 214 (sh, 8470), 220 (sh, 7630), 226 (sh, 5370), 301 (br., 18640). IR (KBr): 3440s, 3140w, 2200–3600 br., 1693m, 1662m, 1605s. ¹H-NMR ((D₆)DMSO, 100 MHz): 5,96 (d, J = 15,5, 1H); 6,36 (m, w_{1/2} = 6, 1H); 6,76 (m, w_{1/2} = 6, 1H); 7,14 (m, w_{1/2} = 5, 1H); 7,48 (d, J = 15,5, 1H); 11,12 (br., ca. 1H); 11,70 (br., 1H). MS (EI): 137 (100, M⁺), 120 (45), 109 (8), 92 (56), 83 (9), 80 (19), 65 (38), 63 (15), 57 (3), 55 (5), 54,5 (4), 54 (3), 53 (6), 52 (3), 51 (4), 50 (3), 46 (6), 45,5 (2), 45 (3), 44 (4), 43 (3), 42 (2), 41 (10), 40,5 (3), 40 (3), 39 (26), 28 (14), 18 (7). Mikrotitration (Methylcellosolve/H₂O 8:2): pK_{MCS}^{*} 7,60; Äquiv.-Gew. 143. Anal. ber. für C₇H₇NO₂ (137,136): C 61,31, H 5,14, N 10,21; gef.: C 61,19, H 5,10, N 10,19.

(E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propensäureamid (**2**). Schmp. 141–142°. UV (EtOH): 215 (sh, 11050), 221 (sh, 10500), 227 (sh, 8070), 301 (19400). IR (KBr): 3475m, 3420m, 1655s, 1628w, 1585s. ¹H-NMR ((D₆)DMSO, 100 MHz): 6,12 (d, J = 16, 1H); 6,25 (m, w_{1/2} = 8, 1H); 6,74 (m, w_{1/2} = 8, 1H); 7,01 (m, w_{1/2} = 6, 1H); 7,32 (d, J = 16, 1H); ca. 7,20 (br., z. T. verdeckt, 2H); 10,97 (br. s, 1H). MS: 136 (83, M⁺), 120 (88), 108 (6), 107 (5), 92 (100), 82 (7), 80 (19), 65 (36), 63 (24), 54 (7), 53 (7), 52 (6), 51 (7), 50 (5), 46 (7), 44 (13), 41 (11), 39 (38), 28 (22), 18 (4). Anal. ber. für C₇H₈N₂O (136,154): C 61,74, H 5,91, N 20,58; gef.: C 61,70, H 5,85, N 20,57.

(E)-3-(1H-Pyrrol-3-yl)-2-propensäuremethylester (**3**). Zu 242 mg **1** in MeOH wurden 13 ml CH₂N₂ in Et₂O getropft. Nach 5 min bei RT. wurde i. V. eingedampft und der Rückstand (265 mg) an 20 g Kieselgel chromatographiert. Das Eluat wurde aus Et₂O/Petroläther umkristallisiert und bei 68° (0,01 Torr) sublimiert. Farblose Kristalle, Schmp. 82–83°. UV (EtOH): 213 (sh, 8480), 220 (sh, 7140), 227 (sh, 4910), 306 (21430). IR (KBr): 3280, 1690, 1625. ¹³C-NMR (CDCl₃, 25 MHz): 51,4 (q); 106,5 (d); 112,6 (d); 120,3 (d); 120,6 (s); 121,9 (d); 139,7 (d); 169,0 (s). MS: 151 (69, M⁺), 120 (100), 108 (2), 107 (1), 106 (2), 92 (74), 80 (3), 79 (2), 65 (32), 63 (15), 60 (5), 53 (1), 52 (2), 51 (2), 50 (1), 46 (8), 41 (4), 39 (17), 28 (8), 18 (2), 15 (3). Anal. ber. für C₈H₉NO₂ (151,162): C 63,56, H 6,00, N 9,27; gef.: C 63,57, H 5,94, N 9,22.

Synthetische Vergleichspräparate. Synthetisches **1** [2] gab aus AcOEt blass cremefarbige Kristalle, Schmp. 182–184°. DC, IR, ¹H-NMR, MS und Farbreaktion mit *Ehrlich*-Reagens wie natürl. **1**. Anal. ber. für C₇H₇NO₂ (137,136): C 61,31, H 5,14, N 20,21; gef.: C 61,26, H 5,29, N 10,15.

Die aus 78 mg **1** in 30 ml abs. CHCl₃ mit 0,5 ml Oxalylchlorid (2,5 h Rückfluss) bereitete Säurechloridlsg. wurde i. V. auf die Hälfte eingengt, um das überschüssige Oxalylchlorid zu entfernen. In die mit abs. CHCl₃ auf das ursprüngliche Volumen verdünnte Lsg. wurde während 1 h durch ein Kapillarrohr NH₃ eingeleitet. Nach dem Vermischen mit H₂O wurde mit HCl auf pH 6 eingestellt, filtriert und 4mal mit AcOEt ausgeschüttelt. Das Rohprodukt wurde wie natürl. **2** an Kieselgel und *Sephadex LH-20* chromatographiert und dann aus AcOEt umkristallisiert. Schmp. 142–143°. DC, IR, ¹H-NMR, MS und Farbreaktion mit *Ehrlich*-Reagens wie natürl. **2**.

Die Mikroanalysen verdanken wir Herrn D. Manser, die NMR Fr. E. Brandenburg und die MS Frau L. Golgowski, ETH Zürich.

Anmerkung bei der Korrektur. – Die kürzlich in einem Patent beschriebenen Antibiotica AIS-2M-3 und AIS-2M-7 aus *Streptomyces orientalis* enthalten die Säure **1** als wesentlichen Baustein [9].

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Meyer, W. Keller-Schierlein, H. Drautz, W. Blank, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 83.
- [2] I. M. Labouta, P. Jacobsen, P. Thorbek, P. Krogsgaard-Larsen, H. Hjeds, *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1982**, *36*, 669.
- [3] H. Plieninger, R. El-Berins, R. Hirsch, *Synthesis* **1973**, 422.
- [4] C. Coronelli, A. Vigevani, B. Cavalleri, G. G. Gallo, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 497; A. D. Argoudelis, H. Hoeksema, H. A. Whaley, *ibid.* **1972**, *25*, 432; M. O. Chaney, P. V. Demarco, N. D. Jones, J. L. Occolowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1932; G. D. Smith, W. L. Duax, *ibid.* **1976**, *98*, 1578; Y. Badar, A. K. Chopra, H. W. Dias, M. B. Hursthouse, A. R. Khokhar, M. Ito, T. P. Toube, B. C. L. Weedon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 1372; J. W. Westley, R. H. Evans, Ch.-M. Liu, T. Hermann, J. F. Blount, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6784; J. W. Westley, R. H. Evans, L. H. Sello, N. Troupe, Ch.-M. Liu, J. F. Blount, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 100; M. J. Zmijewski, *ibid.* **1980**, *33*, 447; L. David, S. Emadzadeh, *ibid.* **1982**, *35*, 1616.
- [5] H. Imanaka, M., Kousaka, G. Tamura, K. Arima, *J. Antibiot., Ser. A* **1965**, *18*, 207; K. Gerth, W. Trowitzsch, V. Wray, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1101.
- [6] L. Bassi, B. Joos, P. Gassmann, H. P. Kaiser, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 92.
- [7] R. Hütter, 'Systematik der Streptomyceten', Verlag Karger AG, Basel, 1967.
- [8] T. Aoyagi, M. Kumagai, T. Hazato, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 555; M. Kumagai, H. Naganawa, T. Aoyagi, H. Umezawa, H. Nakamura, Y. Iitaka, *ibid.* **1975**, *28*, 876; M. Kumagai, T. Aoyagi, H. Umezawa, *ibid.* **1976**, *29*, 696.
- [9] S. Iwadare, **1982**, Japan. Pat. 82-206 676; *J. Antibiot.* **1984**, *37*, Anh. 84-204.