

32)

Sonderdruck aus

Archiv der Pharmazie

304. Band, Heft 3, Seite 188–194

Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr.

W. Wiegrebe, L. Faber und Th. Breyhan

**Zur Frage der absoluten Konfiguration zweier Alkaloide aus
Cynanchum vincetoxicum (L.) Pers.**

W. Wiegrebe, L. Faber und Th. Breyhan

Zur Frage der absoluten Konfiguration zweier Alkaloide aus *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers. *) **)

Aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig und dem Chemischen Untersuchungslaboratorium der Forschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode.
(Eingegangen am 19. Juni 1970).

Durchgreifender Ozon-Abbau des (-)-2,3,6-Trimethoxy-9,11,12,13,13a,14-hexahydro-dibenzo-[f, h] pyrrolo [1,2-b]-isochinolins führt zu ω -Aminocarbonsäuren und zu Prolin. Die Reaktionsfähigkeit dieser α -Aminosäure mit der D-Aminosäuren-Oxidase (EC. 1.4.3.3) weist auf die R-Konfiguration an C-13a des o. a. Alkaloids hin.

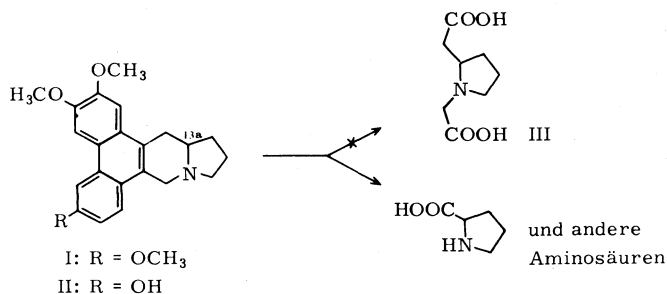
The Absolute Configuration of two Alkaloids in *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers.

Rigorous ozone degradation of (-)-2,3,6-trimethoxy-9,11,12,13,13a,14-hexahydro-dibenzo-[f, h]-pyrrolo [1,2-b]-isoquinoline produces ω -aminocarboxylic acids and proline. The possibility of this α -amino acid reacting with D-amino acid-oxidase (EC. 1.4.3.3) indicates the R-configuration at C-13a of the alkaloid mentioned above.

* Herrn Prof. Dr. phil. Dr. med. h. c. H. H. Inhoffen in Dankbarkeit und Verehrung zum 65. Geburtstag gewidmet.

** 4. Mitt. über *Cynanchum vincetoxicum*; 3. Mitt. Arch. Pharmaz. im Druck. 303, 1009 (1970).

Vor einiger Zeit berichteten wir über die Strukturaufklärung¹⁾ und die Synthese²⁾ der Alkaloide I und II (als Racemate) aus *Cynanchum vincetoxicum*.



In dieser Arbeit sollen Untersuchungen zur Frage der absoluten Konfiguration am Chiralitätszentrum C-13a mitgeteilt werden.

Corrodi und Hardegger³⁾ haben durch Ozonolyse Colchicin, Norapocodein und Tetrahydropapaverin zu optisch aktiven Aminosäuren abgebaut. Bei schonendem Abbau wird Phenanthren von Ozon nur an der C-9, C-10-Doppelbindung angegriffen⁴⁾, unter energischen Bedingungen sollte dagegen der gesamte aromatische Molekülteil von I zerstört werden, zumal die Sauerstofffunktionen die Reaktivität erhöhen.

I wurde in verd. Ameisensäure mit Ozon umgesetzt. Nach oxidativer Aufarbeitung fanden wir statt der gesuchten 1,2-Pyrrolidin-diessigsäure III mehrere tertiäre Amine in geringer Menge, die sich nicht mit Dragendorff's-Reagens nachweisen ließen, wohl aber nach pc Trennung mit Methyljodid, Silbernitrat-Lösung und Photo-Entwickler nach Kiessling und Porath⁵⁾. Für präparative Untersuchungen schieden deshalb diese Verbindungen aus. Daneben fanden wir mindestens 4 ninhydrin-positive Aminosäuren, die demnach durch Spaltung wenigstens einer C-N-Bindung entstanden sein mußten. Zur präparativen Trennung dieses Gemisches verwendeten wir das von Hirs, Moore und Stein⁶⁾ entwickelte System der Ionenaustauscherchromatographie.

Da in erster Linie saure Aminosäuren erwartet wurden, chromatographierten wir das Gemisch an einem Anionenaustauscher in der Acetat-Form. Wir beobachteten keinen Trenneffekt und schlossen daraus, daß in dem o. a. Gemisch keine sauren Aminosäuren vorlagen. Die Chromatographie an einem Kationenaustauscher in einer temperierten Säule⁶⁾ durch Gradientenelution mit 1 bis 4 n HCl war erfolgreich und

1 W. Wiegrebe, L. Faber, H. Brockmann jr., H. Budzikiewicz und U. Krüger, *Liebigs Ann. Chem.* **721**, 154 (1969).

2 W. Wiegrebe, L. Faber und H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* **733**, 125 (1970).

3 H. Corrodi und E. Hardegger, *Helv. chim. Acta* **38**, 2030, 2038 (1955); **39**, 889 (1956).

4 P. S. Bailey, *Chem. Rev.* **58**, 961 (1958); dort weitere Lit.-Angaben.

5 H. Kiessling und J. Porath, *Acta chem. Scand.* **8**, 659 (1954).

6 C. H. W. Hirs, S. Moore und W. H. Stein, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 6063 (1954).

führte zu einheitlichen Lösungen von vier Verbindungen. Die Aminosäuren lagen jedoch in so geringer Konzentration vor, daß sie nicht kristallisiert werden konnten.

Ein Viertel des o. a. Aminosäurengemisches wurde im Spinco Aminosäuren-Analysator, Beckman-Instruments, 120 untersucht. Von folgenden Aminosäuren wurden mehr als 1 μMol nachgewiesen: Prolin 1,7 $\mu\text{Mol} \approx 0,2 \text{ mg}$; Glycin 6,3 μMol ; β -Alanin 13,7 μMol und γ -Aminobuttersäure 13,0 μMol . Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die präparativ gewonnenen Aminosäuren durch Vergleich mit authentischen Verbindungen pc und dc als die o. a. Aminosäuren identifiziert. Prolin wird unter gleichen Bedingungen durch Ozon ebenfalls zu γ -Aminobuttersäure, β -Alanin und Glycin abgebaut und ist folglich als Zwischenprodukt anzusehen.

Da allein Prolin zur Konfigurationsbestimmung verwendbar ist, versuchten wir, seinen Anteil am Aminosäurengemisch durch Abänderung der Versuchsbedingungen zu erhöhen. Da tertiäre Amine in neutralen Lösungsmitteln zu Aminoxiden umgesetzt werden⁷⁾, kamen nur Säuren als Reaktionsmedien in Betracht. Wir ersetzten Ameisensäure durch Eisessig bzw. sehr verd. Schwefelsäure⁸⁾, schlossen dabei die Möglichkeit, bei tiefen Temperaturen zu arbeiten, aus und konnten Prolin auch bei verkürzten Reaktionszeiten nicht in größerer Menge erhalten.

Für die Konfigurationsbestimmung standen etwa 0,2 mg Prolin zur Verfügung, die zwar frei von anderen Aminosäuren waren, jedoch Ionenaustauscher enthielten. Da die Substanzmenge für weitere Reinigungsoperationen nicht ausreichte, bestimmten wir die Konfiguration des Prolins durch enzymatische Analyse. Krebs⁹⁾ fand in Schweinenieren ein Enzym, das spezifisch D-Aminosäuren abbaut. Dixon und Kleppe¹⁰⁾ bestätigten die Spezifität und fanden, daß diese D-Aminosäuren-Oxidase (EC 1.4.3.3) besonders gut mit D-Prolin reagiert.

Konfigurationsbestimmungen von Aminosäuren durch enzymatischen Abbau direkt auf dem PC sind u. a. von Jones¹¹⁾, Synge¹²⁾ und Auclair und Patton¹³⁾ durchgeführt worden. Diese Autoren besprühten die PC nach dem Entwickeln mit gepufferter Enzymlösung und detektierten ggfs. nicht umgesetzte Aminosäuren mit Ninhydrin oder die aus dem enzymatischen Abbau entstandenen α -Ketosäuren vgl.¹³⁾ mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Diese Methode war für uns auch in abgewandelter Form nicht brauchbar, weil das enzymhaltige Sprühreagens nach der Detektion mit Isatin eine gelbgrüne Färbung hinterließ, die die photometrische Auswertung beeinträchtigte.

Zur Konfigurationsbestimmung kleiner Mengen Prolin entwickelten wir daher folgendes Verfahren: Prolin wird mit einem Überschuß an Enzym unter den Ver-

7 L. Horner, Chem. Ber. 91, 75 (1958).

8 F. v. Bruchhausen und P. H. Gericke, Arch. Pharmaz. 269, 115 (1931).

9 H. A. Krebs, Biochem. J. 29, 1620 (1935).

10 M. Dixon und K. Kleppe, Biochim. Biophys. Acta 96, 357 (1965).

11 T. S. G. Jones, Biochem. J. 42, lix (1948).

12 R. L. M. Synge, Biochem. J. 44, 542 (1949).

13 J. L. Auclair und R. L. Patton, Rev. Canad. Biol. 9, 3 (1950).

hältnissen einer Endwertbestimmung¹⁴⁾ umgesetzt, aliquote Teile des Haupt- und Leerwertes werden nach der Inkubation mit D-Aminosäuren-Oxidase pc untersucht, Prolin wird mit Isatin detektiert¹⁵⁾, die Färbungen werden eluiert und colorimetriert¹⁶⁾. Für eine manometrische Bestimmung¹⁷⁾ reichte das vorliegende Prolin nicht aus. Die in Betracht kommenden Prolin-Mengen konnten mit dem kombinierten PC-Colorimetrie-System mit einer Fehlerquote $\leq 10\%$ bestimmt werden, die Nachweisgrenze liegt bei $0,5 \gamma$.

Prolin wurde in einer für solch kleine Mengen geeigneten Apparatur (Exp. Teil) mit gepufferter Enzym-Lösung umgesetzt; in einem aliquoten Teil wurde der Gehalt an nicht umgesetztem Prolin bestimmt. Wir prüften die Brauchbarkeit unseres Systems an L- und D, L-Prolin und fanden, daß durch die Enzymeinwirkung 4 bis 8 % des L-Prolins bzw. 51 % des D, L-Prolins (d. h. der Anteil an D-Prolin im Racemat) abgebaut wurden. Da das durch Ozonolyse von I erhaltene Prolin zu 89 % umgesetzt wird, werten wir diesen Befund als Hinweis auf die D-Konfiguration in dem fraglichen Prolin und damit auf eine R-Konfiguration an C-13a in I. Da II zu I methyliert werden kann, gilt dieser Hinweis auch für II.

Beschreibung der Versuche

Ozonolyse des (-)-Alkaloids A

Es wurde ein Ozonisator der Fa. Gebr. Herrmann, Köln-Ehrenfeld, Typ Lab.-50-I, verwendet. Bei einer Spannung von 22500 V und einem Gasdurchfluß von 4,5 l/Std. enthielt das Gasgemisch 5,2 Gew.-% Ozon. 500 mg Alkaloid I wurden in 25 ml 10 proz. Ameisensäure bei Raumtemp. 24 Std. ozonisiert. Die Lösung färbte sich schnell dunkelbraun und wurde im Verlauf von 4 Std. farblos. Nach beendeter Ozonolyse wurde das Reaktionsgemisch mit 5 ml 30 proz. H₂O₂ und 5 ml 98 proz. Ameisensäure 3 Std. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Zerstörung des überschüssigen Peroxids mit Pt-Schwarz wurde das Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt und die wäßr. Phase i. Vak. eingedampft. Um die Ameisensäure vollständig zu vertreiben, wurde der Rückstand insgesamt dreimal in Wasser gelöst und jeweils i. Vak. eingedampft. Entstandene Oxalsäure wurde durch Zugabe von Barytwasser gefällt. Aus dem Filtrat wurden überschüssige Bariumionen mit 0,5 n H₂SO₄ gefällt. Das PC (s. u., System III) zeigte 4 ninhydrin-positive Substanzen. Die Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der Rückstand in 5 ml Wasser aufgenommen. 1,5 ml dieser Lösung wurden für die Analyse im Aminosäuren-Analysator (siehe dort), der Rest für die präp. Trennung der Aminosäuren verwendet (siehe dort).

Präparative Trennung des Aminosäuregemisches

Die Aminosäuren wurden am Kationenaustauscher Dowex 50 W x 4, 200–400 mesh, der in der H⁺-Form vorlag, in einer auf 50° thermostatisierten Säule von 150 cm Länge und 1 cm ϕ

14 H. U. Bergmeyer in: H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 1962, S. 4.

15 J. Barrolier, J. Heilmann und E. Watzke, Z. physiolog. Chem. 304, 21 (1956).

16 E. Hrabetová und J. Tupy, J. Chromatog. 3, 199 (1960).

17 vgl. P. Boulanger und R. Osteux in Bergmeyer, loc. cit., S. 367.

chromatographiert. Nachdem 250 ml n HCl die Säule passiert hatten, wurde in die Mischkammer (250 ml Dreihalskolben mit Magnetrührer) 4 n HCl eingespeist. Das Elut wurde in Fraktionen zu ca. 1,5 ml aufgefangen. Die Aminosäuren waren in den Fraktionen 455–462, 483–494, 519–551 und 605–612 enthalten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und bei 40°, 12 Torr eingedampft. Um restliche Chloridionen und gelösten Ionenaustauscher zu entfernen, wurden die Rückstände in 2 ml 0,5 n Essigsäure aufgenommen und am Anionenaustauscher (Dowex 1 x 8, 400 mesh, Acetatform) in Säulen von 4 cm Länge und 1 cm ϕ mit 0,5 n Essigsäure chromatographiert. Nach Eindampfen i. Vak. wurden die im theor. Teil aufgeführten Aminosäuren erhalten.

Analyse des Aminosäuregemisches im Aminosäuren-Analysator

Die zu analysierende Lösung wurde im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und der Rückstand mit der vorgeschriebenen Pufferlösung von pH = 2,2 aufgenommen. Von der klaren Lösung wurde 1 ml auf die 150 cm lange Säule pipettiert und mit Stickstoff eingepreßt. Es wurde mit 1 ml Pufferlösung nachgewaschen und die Analyse bei 50° Säulentemp. mit Citratpufferlösung vom pH 3,25 gestartet. Nach 9 Std. Laufzeit erfolgte automatische Umschaltung auf Citratpuffer pH 4,25, der bis zur Beendigung der Analyse benutzt wurde (Gesamtlaufzeit 32 Std.). Die Lage der einzelnen Aminosäuren wurde durch die Anwendung von Testsubstanzen in reproduzierbarer Weise gesichert. Die Position des Prolins kennzeichnet sich außerdem durch die Lage der Absorptionskurve bei 440 nm über den bei 570 nm und bei zwei verschiedenen Schichtdicken aufgezeichneten Kurven der normalen Ninhydrinreaktion.

Die Gegenwart von Citrullin im Elutionsbereich des Prolins konnte durch Modellsubstanzenanalysen ausgeschlossen werden. In diesem Fall würde die Gauß'sche Kurve einen atypischen Verlauf zeigen.

Die Analyse auf Hexonbasen und andere basische Komponenten mittels der 50 cm langen Säule bei 50° Säulentemp. und unter Anwendung eines Citratpuffers pH 5,28 zeigte außer Ammoniak in geringer Menge keine ninhydrin-positiven Substanzen.

Identifizierung der präp. getrennten Aminosäuren

Die präparativ isolierten Aminosäuren wurden durch Vergleich mit den analytisch bestimmten Aminosäuren in den u. a. chromatographischen Systemen I, II und III identifiziert. Detektion: Ninhydrin

Fraktion	Glycin 455–462	β -Alanin 483–494	γ -Aminobutters. 519–551	Prolin 605–612
I	Rf 0,22	Rf 0,32	Rf 0,37	Rf 0,54
II	Rf 0,45	Rf 0,41	Rf 0,32	Rf 0,35
III	Rf 0,19	Rf 0,29	Rf 0,37	Rf 0,32

I: Kieselgel GF₂₅₄ (Merck); Wasser/Phenol (25:75)

II: Kieselgel GF₂₅₄ (Merck); Wasser/Äthanol (30:70)

III: Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b; Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), obere Phase, absteigend, senkrecht zur Fließrichtung des Papiers.

Photometrische Bestimmung des Prolins

Wir trugen L-Prolin in wäsr. Lösung (15,7 mg/100 ml) in Mengen von 0,5 bis 8 γ punktförmig auf Papier (Schleicher und Schüll, Nr. 2043b) auf und entwickelten die PC absteigend, senkrecht zur Fließrichtung des Papiers, mit Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) als Fließmittel. Laufzeit: 20 Std.; Rf 0,32. Zur Detektion wurden die PC in eine Lösung aus 1 g Isatin, 1,5 g Zn-Acetat, 5 ml Wasser, 1 ml Eisessig und 95 ml Isopropanol getaucht und anschließend 30 Min. im Trockenschrank auf 80° erhitzt. Die Zone, die die Substanzen enthielt, wurde herausgeschnitten und mit Wasser von 20° gewaschen, bis der Hintergrund weiß war. Nach Trocknung im Dunkeln wurden gleichgroße Stücke, die die blauen Flecke enthielten, herausgeschnitten, geschnitzelt, mit je 5 ml einer Lösung aus 72 g Phenol und 28 g Wasser übergossen und im Dunkeln unter gelegentlichem Umschütteln 30 Min. extrahiert. Die Extinktionen der zentrifugierten Lösungen wurden bei 610 nm in 1 cm-Küvetten bestimmt. Als Nullwert wurde ein gleichgroßes ungefärbtes Stück Papier desselben Streifens auf gleiche Weise extrahiert. Die Extinktionen lagen zwischen 0,01 und 0,30. Mengen von 3 γ aufwärts ließen sich mit einer Fehlerquote $\leq 10\%$ bestimmen, sofern die Substanzen von einem Streifen stammten. Die Farbindensitäten entsprachen dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

	ml Prolin-Lösung	E _{610nm}
1. Streifen:	0,01	0,03
	0,02	0,06
	0,03	0,094
2. Streifen:	0,014	0,052
	0,025	0,099
	0,04	0,162

0,01 ml = 1,57 γ Prolin

Einwirkung der D-Aminosäuren-Oxidase auf L- bzw. D, L-Prolin

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

Puffer I (0,1 m Diphosphatpuffer): 8,922 g Na₄P₂O₇ · 10 H₂O werden in Wasser zu 100 ml gelöst und nach Zugabe von 8 ml n HCl mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

Puffer II (0,067 m Diphosphatpuffer): 1 T. Puffer I wird mit 2 T. Wasser verdünnt.

Die Enzymlösung wurde aus einem Teil D-Aminosäuren-Oxidase (EC 1.4.3.3; 5 mg/ml) der Fa. C. F. Boehringer & Söhne GmbH Mannheim und 2 T. Puffer II bereitet. In vier Mikroeagenzgläser (7 cm Länge, 0,7 cm ϕ) wurden folgende Lösungen pipettiert:

D,L-Prolin (14 mg/50 ml Wasser)

I Hauptwert:	0,050 ml D,L-Prolin-Lös.	II Leerwert:	0,050 ml D,L-Prolin-Lös.
	0,025 ml Puffer I		0,025 ml Puffer I
	0,030 ml Enzym-Lös.		0,030 ml Puffer II

L-Prolin (16,8 mg/50 ml Wasser)

III Hauptwert:	0,050 ml L-Prolin-Lös.	IV Leerwert:	0,050 ml L-Prolin-Lös.
	0,025 ml Puffer I		0,025 ml Puffer I
	0,030 ml Enzym-Lös.		0,030 ml Puffer II

Apparatur: Die 4 Reagenzgläschen wurden an einer etwa 45° geneigten Welle eines KPG-Rührers parallel zur Welle befestigt und in einem mit Sauerstoff gefüllten 1 l-Dreihalskolben bei 37° (Wasserbad mit Thermostat) durch ein Rührwerk langsam gedreht. Um eine wasserdampfhaltige Atmosphäre zu erzeugen, enthielt der Kolben 50 ml Wasser. Nach 3,5 stdg. Reaktionszeit wurden aus jedem Reagenzglas 6 x 0,010 ml entnommen und nach PC photometrisch ausgewertet.

D,L-Prolin: Hauptwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,11$; Leerwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,223$; Abbaurrate: 51 %

L-Prolin: Hauptwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,26$; Leerwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,285$; Abbaurrate: 8 %

Zur Prüfung, ob evtl. der Ionenaustauscher die enzymatische Reaktion beeinflussen könnte, wurden 1,98 mg D,L-, bzw. 2,10 mg L-Prolin an Ionenaustauscher (Dowex 1 x 8, 400 mesh, Acetat-form) in Säulen von 4 cm Länge und 1 cm ϕ mit 0,5 n Essigsäure chromatographiert. Die Elute (je ca. 100 ml) wurden i. Vak. eingedampft und die Rückstände in je 5 ml Puffer II gelöst. Die Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

D,L-Prolin (0,01 ml = 4 γ Prolin)

I Hauptwert: 0,075 ml D,L-Prolin-Lös.
0,030 ml Enzym-Lös.

II Leerwert: 0,075 ml D,L-Prolin-Lös.
0,030 ml Puffer II

L-Prolin (0,01 ml = 4,2 γ Prolin)

III Hauptwert: 0,075 ml L-Prolin-Lös.
0,030 ml Enzym-Lös.

IV Leerwert: 0,075 ml L-Prolin-Lös.
0,030 ml Puffer II

Je 0,05 ml wurden nach PC photometrisch ausgewertet. Die Abbauraten entsprachen denen der 1. Versuchsreihe.

D,L-Prolin: Hauptwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,162$; Leerwert: $E_{610} = 0,335$; Abbaurrate: 51 %

L-Prolin: Hauptwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,375$; Leerwert: $E_{610} = 0,390$; Abbaurrate: 4 %

Einwirkung der D-Aminosäuren-Oxidase auf das durch Abbau erhaltene Prolin.

Das in seiner Konfiguration zu bestimmende Prolin wurde in 0,4 ml Wasser gelöst und der Gehalt dieser Lösung durch Vergleich mit einer L-Prolin-Lösung bekannter Konzentration nach PC photometrisch bestimmt. Die Lösung enthielt 4 γ /0,01 ml Prolin. Es wurden folgende Lösungen in der o. a. Weise umgesetzt:

Hauptwert: 0,050 ml Prolin-Lös.
0,025 ml Puffer I
0,030 ml Enzym-Lös.

Leerwert: 0,050 ml Prolin-Lös.
0,025 ml Puffer I
0,030 ml Puffer II

Für die quantitativen Bestimmungen wurde je 0,060 ml entnommen.

Hauptwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,038$; Leerwert: $E_{610} \text{ nm} = 0,353$; Abbaurrate: 89 %

Wir danken den Herren Prof. Dr. M. Dixon, Cambridge, und Dr. D. Jaworek, Fa. Boehringer Mannheim, für wertvolle Diskussionen.

Dem Land Niedersachsen sind wir für die Förderung dieser Arbeit durch Forschungsmittel zu Dank verpflichtet.