

PETER ROSENMUND

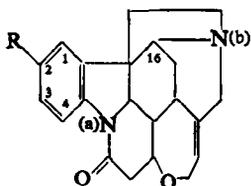
 β -Colubrin aus Strychnin

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

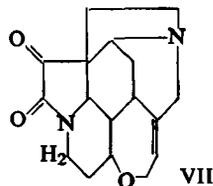
(Eingegangen am 25. April 1962)

Aus 2-Diazo-strychnin konnte durch Phenolverkochung die mutmaßliche biologische Vorstufe des β -Colubrins, das 2-Hydroxy-strychnin gewonnen werden. Durch Methylierung mit Diazomethan erhielt man daraus in guter Ausbeute β -Colubrin. Die Thioanaloga des Hydroxystrychnins und des β -Colubrins werden beschrieben.

β -Colubrin (I), ein von K. WARNAT¹⁾ aus Strychnin-Mutterlaugen isoliertes Nebenalkaloid des Strychnins (II), war bisher wegen seines dem Strychnin weitgehend ähnlichen Reaktionsverhaltens und seines spärlichen Vorkommens nur selten Gegenstand der Bearbeitung. K. WARNAT¹⁾ erhielt durch einen SPÄTH-BRETSCHNEIDERSCHEN Abbau aus β -Colubrin 5-Methoxy-anthranilsäure, S. P. FINDLAY²⁾ durch Chromsäureabbau aus Strychnin wie aus β -Colubrin das gleiche Dioxonucin (VII), welches bis auf den aromatischen Teil des Moleküls sämtliche Atome in unveränderter Verknüpfung enthält. Eine Kombination beider Befunde ergab, daß dem β -Colubrin die Konstitution eines 2-Methoxy-strychnins zukommt.



- I: R = OCH₃
 II: R = H
 III: R = OH
 IV: R = SH
 V: R = S-S-Strychnin
 VI: R = SCH₃



Nimmt man für die Biosynthese des β -Colubrins einen ähnlichen Mechanismus an, wie ihn R. B. WOODWARD³⁾ für die des Strychnins vorschlug, so tritt hier an die Stelle des Tryptophans das 5-Hydroxy-tryptophan bzw. das Serotonin. Das aus den drei Aminosäuren Hydroxytryptophan, Dioxiphenylalanin und Glycin bzw. deren biogenen Abbaustufen entstehende 2-Hydroxy-strychnin (III) wird darauf in der Endstufe zu β -Colubrin methyliert. Das 2-Hydroxy-strychnin steht danach zu Strychnin in analogem Verhältnis wie Tryptamin zum biologisch hochaktiven Serotonin.

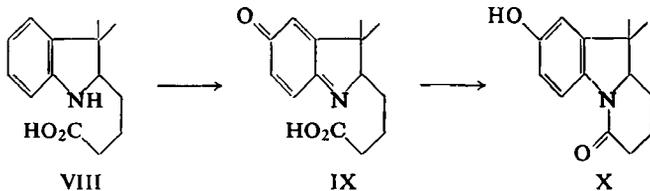
Es war für uns daher von Interesse, die postulierte biologische Vorstufe des β -Colubrins kennenzulernen und die pharmakologischen Eigenschaften dieses 2-Hydroxy-strychnins untersuchen zu lassen. Gleichzeitig war es unser Ziel, einen einfachen Übergang des Strychnins in das β -Colubrin zu finden, um so den noch ausstehenden synthetischen Beweis für die Richtigkeit der Warnatschen und Findlayschen Befunde zu erbringen.

¹⁾ Helv. chim. Acta 14, 997 [1931].

²⁾ J. Amer. chem. Soc. 73, 3008 [1951].

³⁾ Nature [London] 162, 155 [1948].

Theoretisch bietet die Einführung einer Sauerstoff-Funktion in die *p*-Stellung zum Stickstoff (a) am aromatischen Ring keine Schwierigkeiten. Benzolkerne mit OH-Substitution wie auch mit primären oder sekundären Aminosubstituenten neigen bei Einwirkung von Oxydationsmitteln leicht zur Bildung von Chinonen, wobei in *o*- oder *p*-Stellung der Eintritt des Sauerstoffes erfolgt. Im Falle des Strychnins muß zuvor der Lactamring geöffnet werden. Eigene Versuche an der Strychninsäure (VIII) mit Oxydationsmitteln, deren oxydierende Wirkung auf dem Übergang eines Metallions von höherer in niedrigere Wertigkeitsstufe beruht, wie $Ce^{IV} \rightarrow Ce^{III}$, oder $Tl^{III} \rightarrow Tl^I$ führten immer nur zu Verbindungen wahrscheinlich dimeren Charakters, wie sie bereits H. WIELAND beschrieben hat⁴⁾. Bei Verwendung von Kaliumnitrosodisulfonat⁵⁾ dagegen kann man aus Isostrychninsäure in 50-proz. Ausbeute das entsprechende monomere Chinonimin (IX) isolieren. Die Übertragung dieser Reaktion auf Strychninsäure wird aber auf Schwierigkeiten stoßen, da im erforderlichen sauren Reaktionsmedium — die Substanz wird längere Zeit in wäßriger Suspension bei einem pH um 5 geschüttelt — ein Ringschluß der Strychninsäure zurück zum Strychnin zu erwarten ist; Strychnin seinerseits ist jedoch gegen derartige Oxydationen stabil.



Da 2-Diazo-strychnin den gleichen sterischen Bau besitzt wie Strychnin⁶⁾, schien eine Phenolverkochung zu 2-Hydroxy-strychnin aussichtsreich. Gleichwohl stellt die schon beschriebene⁶⁾ thermische Stabilität des Diazostrychnins eine präparative Schwierigkeit dar. Wir konnten mit Rücksicht auf eventuelle Veränderungen des Moleküls — die Umwandlung des Strychnins in Isostrychnin in wäßriger Lösung bei 160° ist ein Beispiel — keine scharfen Bedingungen wählen, sondern beschränkten uns auf Temperaturen um 100°, wobei das Alkaloid noch sicher stabil ist. Stundenlanges Rückflußkochen in 2*n* H₂SO₄ hat aber noch keine vollständige Umsetzung der Diazoniumverbindung zur Folge. Stets konnte nach 2–3stündiger Reaktionsdauer ein erheblicher Prozentsatz Ausgangsmaterial durch Kupplung mit β -Naphthol oder die intensive Stickstoffentwicklung bei Zugabe von Kupferpulver in die noch warme Reaktionslösung nachgewiesen werden. Um Nebenreaktionen nicht zu stark in den Vordergrund treten zu lassen, brachen wir die Reaktion stets nach etwa 3 Stunden ab.

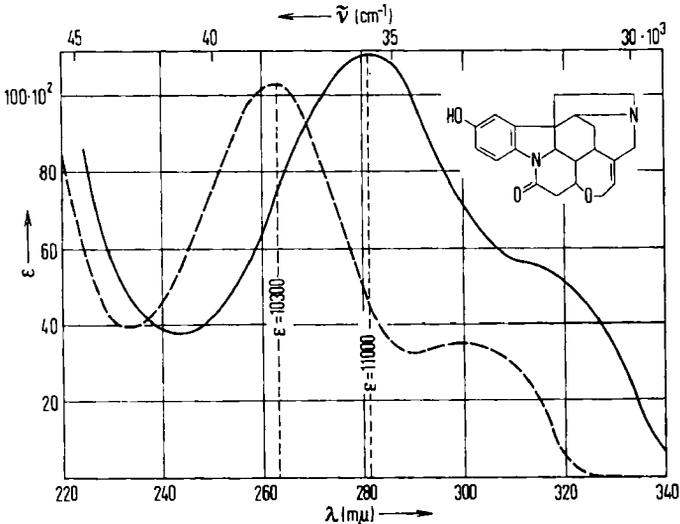
Die Ansätze waren im Durchschnitt zu 60% in wäßriger Natronlauge löslich und kuppelten mit diazotierter Sulfanilsäure; ein kristallines Pikrat bestand aus mehreren Komponenten und ließ sich nach den üblichen Methoden nicht weiter reinigen. Die Papierchromatographie unter Anwendung des Lösungsmittels H (s. Versuchsteil, S. 2642) zeigte nicht weniger als 7 deutlich voneinander unterschiedene Banden auf, von denen die eine vom *R_F*-Wert 0.34 die intensivste Reaktion mit diazotierter Sulfanilsäure lieferte. Durch Elution und Versetzen mit wäßriger Pikrinsäure ließ sich ein in Nadeln fallendes Pikrat gewinnen. Die amphotere Base III ist schwer löslich und zeigt eine

4) H. WIELAND, F. CALVET und W. MOYER, Liebigs Ann. Chem. 491, 107 [1931].

5) H. J. TEUBER und E. FAHRBACH, Chem. Ber. 91, 713 [1958].

6) P. ROSENMUND, Chem. Ber. 94, 3342 [1961].

charakteristische Rotverschiebung des UV-Spektrums im Alkalischen. Die Azokuppung mit 2-Hydroxy-strychnin erfolgt vermutlich in 3-Stellung, da die 1-Stellung durch Wasserstoffatome des C-16 sterisch gehindert ist. Probeweise wurden weitere Banden des Chromatogramms untersucht, deren geringe Substanzmengen jedoch eine genaue Erforschung nicht aussichtsreich erscheinen ließen. Aus III konnten wir mit Acetylchlorid kein Phenolacetat erhalten.



UV-Spektrum von 2-Hydroxy-strychnin in Methanol (---) und in 0,2n methanolischer KOH (—)

Das mit rund 30% Ausbeute aus Aminostrychnin gewonnene III reagiert mit Diazomethan in Chloroform träge zur Methoxyverbindung. Chromatographisch – im Lösungsmittel H – konnten wir, außer etwas Ausgangsmaterial, eine weiterlaufende Bande isolieren, welche mit diazotierter Sulfanilsäure nicht mehr kuppelte. Durch Elution mit Essigsäure isolierten wir die in Natronlauge unlösliche, keine Verschiebung des UV-Spektrums mehr zeigende Base. Die Elementaranalyse lieferte die Werte des β -Colubrins; Schmelzpunkt sowie UV- und IR-Spektrum waren mit den entsprechenden Daten des Naturstoffs identisch.

Mit Methyljodid in alkalischer Lösung wird Hydroxy-strychnin am Stickstoff methyliert. Die deutliche langwellige Verschiebung des UV-Spektrums im Alkalischen legt nahe, daß es sich um ein Isomeres des β -Colubrins, ein Phenolbetain, handelt. Schließlich liefert β -Colubrin selbst mit Methyljodid ein quartäres Salz, das sich deutlich vom Betain unterscheidet.

Sowohl in chemischer als auch in pharmakologischer Hinsicht dürfte ein Vergleich des β -Colubrins mit seinem Thioanalogon, dem 2-Methylmercapto-strychnin (VI), interessant sein. Das in befriedigender Ausbeute zugängliche 2-Rhodan-strychnin ließ sich mit Zink und Salzsäure zum entsprechenden Mercaptan IV reduzieren, einer sauren Verbindung, im Gegensatz zu 2-Hydroxy-strychnin bereits in verdünntem Ammoniak löslich. Der relativ niedrige Schmelzpunkt von 138–142° spricht gegen

die Ausbildung eines inneren Salzes, was bei der sauren Natur der Mercapto-Gruppe denkbar wäre. In alkalisch-wäßriger Lösung wird Mercaptostrychnin vom Luftsauerstoff zu einem amorphen Distrychnin-disulfid (V) oxydiert.

Mit Diazomethan reagiert Mercaptostrychnin stürmisch. Das Chromatogramm des Reaktionsansatzes kurz nach der Zugabe von Diazomethan zeigt die Flecken für Distrychnin-disulfid, Mercaptostrychnin und Thiocolubrin (VI). Bei langer Reaktionsdauer, wie sie zur Methylierung von Hydroxystrychnin notwendig ist, verschwindet der Fleck des Mercaptostrychnins. Fast an der gleichen Stelle tritt eine nicht-saure Substanz auf. Aus Materialmangel konnte die interessante Erscheinung nicht weiterverfolgt werden. Ein Pikrat der Substanz schmolz, da wahrscheinlich nicht rein, unscharf bei 208–213°. Das 2-Methylmercapto-strychnin (VI) dagegen konnte über sein Pikrat in guter Ausbeute rein erhalten werden. Die Löslichkeitseigenschaften der kristallinen Base stimmen weitgehend mit denen von β -Colubrin überein.

Wie Hydroxystrychnin reagiert auch Mercaptostrychnin mit Methyljodid am Stickstoff; das IR-Spektrum zeigt eine freie SH-Gruppe. Die etwas zu hoch gefundenen Analysenwerte werden dahin interpretiert, daß zum geringen Teil Abspaltung von Jodwasserstoff zum Thiobetain auch in neutraler Lösung erfolgt ist. Das aus Thiocolubrin mit Methyljodid erhaltene quartäre Salz zeigt anderen Schmelzpunkt und andere Kristallform.

Ich habe der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, welche mir freundlicherweise eine Probe reines β -Colubrin-sulfat zu Vergleichszwecken überließ, zu danken. Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. TH. WIELAND, der mir in lebenswürdiger Weise manchen Ratschlag erteilte, sowie Fräulein RENATE WETZEL für die Anfertigung der IR-Spektren.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *2-Hydroxy-strychnin (III)*: 2.0 g *2-Amino-strychnin*, gelöst in 10 ccm 2*n* H₂SO₄, werden mit 8 ccm 5-proz. NaNO₂-Lösung diazotiert. Die so erhaltene Diazoniumsalzlösung wird mit 500 ccm 2*n* H₂SO₄ verdünnt und 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man setzt danach der noch siedenden Lösung eine Spatelspitze Kupferbronze zu und wartet die heftige Stickstoffentwicklung ab, wonach man abkühlt, vom Kupfer abfiltriert, schwach ammoniakalisch macht und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformlösungen dampft man i. Vak. ein, suspendiert den Rückstand (1.9 g) in 15 ccm Methanol und läßt langsam in der Wärme insgesamt 50 ccm 2*n* NaOH zutropfen. Darauf versetzt man mit 200 ccm Wasser, filtriert nach 1 stdg. Stehenlassen in der Kälte von Ungelöstem ab und neutralisiert das Filtrat mit Essigsäure genau auf pH 7. Das Ausgeschiedene wird in Chloroform aufgenommen, der Rückstand davon (0.9–1.2 g) in 10-proz. Ameisensäure gelöst und auf Schleicher & Schüll-Chromatographierbögen aufgetragen mit einer Belastung von 0.8 mg pro cm Auftragslänge. Man chromatographiert absteigend im Lösungsmittel H (sek.-Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75 : 15 : 10). Die Bande mit *R_F*-Wert 0.34 wird mittels 1*n* Essigsäure eluiert und das Eluat mit wäßr. Pikrinsäure versetzt, wobei das *Pikrat des 2-Hydroxy-strychnins* in feinen Nadeln ausfällt. Ausb. ca. 40%, ber. auf Aminostrychnin. Die Lösung des Pikrates in Dimethylformamid/Wasser (1 : 1) wird über einer Ionenaustauschersäule Dowex 2 in die Chloridform übergeführt, welche nach dem Einengen i. Vak. und Versetzen mit Ammoniak die freie Base liefert. Sandige, äußerst schwerlösliche Kristalle. Schmp. über 340°. Die 2 mal aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisierte Verbindung ergab:

C₂₁H₂₂N₂O₃ (346.4) Ber. C 71.96 H 6.33 N 8.00 Gef. C 72.08 H 6.25 N 7.71

2. *β -Colubrin (I)*: 400 mg reines, feingepulvertes *III* werden in einem Gemisch von frisch mit Ca entwässertem Methanol und reinem, säurefreiem Chloroform (300 ccm 1 : 1) in der Wärme gelöst, abgekühlt, sodann mit der äther. Lösung von *Diazomethan* aus 2.5 g Nitrosomethylharnstoff versetzt und 48 Stdn. bei 5° aufbewahrt. Der Rückstand aus der anschließend eingedampften Lösung wird, wie unter 1. beschrieben, im Lösungsmittel H chromatographiert. Das β -Colubrin hat den R_F -Wert 0.37. (Die Flecken werden durch Besprühen mit Fluorescein unter der UV-Lampe sichtbar.) Das Pikrat des β -Colubrins, wie unter 1. erhältlich, fällt zunächst in feinen, gelben Nadelchen. Beim Erwärmen wandeln sie sich um in derbe Prismen, zum Teil in Oktaeder mit aufgesetzter Pyramide. Ausb. 84 %, ber. auf 2-Hydroxy-strychnin. Zur Darstellung der Base schüttelt man das Pikrat mit Chloroform und Natronlauge, dampft die Chloroformphase ein und kristallisiert den Rückstand aus verd. Methanol um. Schmp. 222°. $[\alpha]_D^{25}$: -156° ($c = 0.042$, in Chlf.). Völlige Identität der IR-Spektren von natürlichem und synthetischem β -Colubrin.

$C_{22}H_{24}N_2O_3$ (364.4) Ber. C 72.51 H 6.64 N 7.69 Gef. C 72.64 H 6.72 N 6.91

3. *β -Colubrin-N-methojodid*: 100 mg *I* werden, in 1 ccm Methanol gelöst, mit 100 mg *Methyljodid* versetzt. Die bald in Nadeln ausfallende quartäre Verbindung wird abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert, woraus das *Methojodid* in Schuppen ausfällt. Schmp. 318° (Zers.).

$C_{23}H_{27}N_2O_3$ (506.4) Ber. C 54.55 H 5.38 N 5.53 Gef. C 54.49 H 5.70 N 5.51

4. *2-Hydroxy-strychnin-N-methoperchlorat*: 200 mg *III* werden in 2 ccm Methanol unter Zusatz weniger Tropfen 30-proz. Kalilauge gelöst. Dazu fügt man 150 mg *Methyljodid*, worauf nach einigen Stunden Kristalle erscheinen, welche abgesaugt und in Wasser aufgenommen werden. *Perchlorsäure* fällt die Verbindung in Nadeln. Aus Wasser Schmp. 328°.

UV-Absorption in Wasser: λ_{max} 262 m μ , 293 m μ .

in 0.5 n NaOH: λ_{max} 267 m μ , 294 m μ .

$C_{22}H_{24}N_2O_3 \cdot HClO_4$ (464.9) Ber. C 56.83 H 5.42 N 6.03 Gef. C 56.69 H 5.35 N 5.89

5. *2-Mercapto-strychnin (IV)*: 2.0 g *2-Amino-strychnin*, gelöst in 10 ccm 2n H_2SO_4 , werden mit 8 ccm einer 5-proz. Lösung von $NaNO_2$ in Wasser diazotiert, die Diazoniumsalzlösung in eine Mischung aus 3 g *Kupfer(I)-rhodanid*, 250 g *Kaliumrhodanid* und 250 ccm Wasser, welche auf 70° erwärmt ist, in dünnem Strahl eingerührt und das Ganze unter heftigem, schäumendem Rühren innerhalb von 5 Min. auf 90° erhitzt. Unter lebhafter Stickstoffentwicklung hellt sich die anfangs kaffeebraune, klare Lösung unter leichter Trübung nach Orange gelb auf, wobei die Stickstoffentwicklung aufhört. Man kühlt, macht ammoniakalisch und extrahiert mit Chloroform, bis die Chloroformphase nicht mehr nennenswert gefärbt ist. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft, der gelbbraune, halbfeste Rückstand in 2n Essigsäure aufgenommen und in der Hitze mit wäbr. Pikrinsäure gefällt. Ausb. 3.7 g Pikrat. Zur Reinigung löst man in 20 ccm Dimethylformamid und fügt solange Wasser hinzu, bis bei Handwärme eben Trübung auftritt. Beim Abkühlen fallen zunächst schmierige Anteile, welche verworfen werden. Das durch weiteres Versetzen mit Wasser erhaltene Kristalliat wird nochmals umkristallisiert, das reine *Rhodanstrychninpikrat* durch Behandeln mit Chloroform und Natronlauge in die farblose Base übergeführt, welche unmittelbar mit 30 ccm 2n HCl, 20 ccm Äthanol und 20 g *Zinkgranalien* 6 Stdn. unter Rückfluß erhitzt wird. Nach Maßgabe des Verbrauches an Salzsäure fügt man wenig konz. Salzsäure hinzu, dampft gegen Ende den Alkohol durch den Kühler ab und läßt im Eisschrank auskristallisieren. Das Zinkdoppelsalz löst man nach dem Absaugen in 150 ccm heißem Wasser, macht natronalkalisch und fällt mit H_2S . Das Filtrat davon wird unter Ausschluß von Sauerstoff i. Vak. auf 30 ccm eingeengt und mit 2n Essigsäure das *Mercaptostrychnin* bei pH 8 als weißes Pulver ausgefällt.

Ausb. wechselnd zwischen 300 und 600 mg. Aus Methanol kommen winzige, zu kugeligen Aggregaten vereinigte Nadeln. Schmp. 139—142° (Aufblähen bei 110°).

Zur Analyse kam das an der Luft haltbare *Pikrat*. Man gewinnt es durch Versetzen der wäbr. Lösung des Zinkdoppelsalzes mit Pikrinsäure. Es läßt sich aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisieren zu dunkelgelbem Pulver, welches in Natronlauge restlos löslich ist. Kein Schmp., langsame Verkohlung ab 150°.

$C_{21}H_{22}N_2O_2S \cdot C_6H_3N_3O_7$ (595.6) Ber. C 54.45 H 4.23 N 11.76

Gef. C 54.41 H 4.33 N 11.56

6. *2-Methylmercapto-strychnin* (β -*Thiocolubrin*, VI): 500 mg aus Methanol umkristallisiertes *Mercaptostrychnin* (IV) werden, in 100 ccm Methanol gelöst, mit äther. *Diazomethan* aus 2.5 g Nitrosomethylharnstoff versetzt. Unter Aufschäumen läuft die Reaktion innerhalb kurzer Zeit ab. Man dampft nach $\frac{1}{2}$ Stde. das Lösungsmittel ab und chromatographiert den Rückstand, wie unter 1. und 2. beschrieben, im Lösungsmittel H. Darin haben *Mercaptostrychnin*, *Thiocolubrin* und das unten beschriebene *Distrychnin-disulfid* die R_F -Werte 0.48, 0.53 und 0.23. β -*Thiocolubrin* bildet aus Methanol derbe Prismen vom Schmp. 170—172°. $[\alpha]_D^{25}$: -148° ($c = 0.15$, in Chlf.).

$C_{22}H_{24}N_2O_2S$ (380.4) Ber. C 69.44 H 6.36 N 7.36 Gef. C 69.20 H 6.33 N 7.44

7. *Distrychnin-disulfid* (V): *Mercaptostrychnin* (IV), in wäbr. Natronlauge gelöst, wird unter Durchleiten von Luft geschüttelt, bis das Filtrat an der Luft keine Nachfällung mehr ergibt. Man fällt aus Dimethylformamid/Wasser zu einem amorphen Pulver um. Ausb. quantitativ.

$C_{42}H_{42}N_4O_4S_2$ (730.9) Ber. C 69.01 H 5.79 N 7.67 Gef. C 68.70 H 5.37 N 7.48

8. β -*Thiocolubrin-methojodid*: *Thiocolubrin* (VI) wird in methanol. Lösung mit *Methyljodid* versetzt und 1 Stde. bei 40° stehengelassen. Die ausgefallenen Nadeln werden abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Lanzettförmige, leicht gebogene Nadeln. Schmp. 311° (Zers.).

$C_{23}H_{27}JN_2O_2S$ (522.4) Ber. C 52.88 H 5.21 N 5.36 Gef. C 52.87 H 5.11 N 5.55

9. *2-Mercapto-strychnin-N-methojodid*: 100 mg *Mercaptostrychnin* (IV) werden in 1 ccm Methanol gelöst unter Zusatz eines Überschusses an $2n$ KOH und *Methyljodid*. Das nach wenigen Min. ausfallende quartäre Salz wird abgesaugt und aus Wasser zu langen Nadeln umkristallisiert. Schmp. 322° (Zers.).

$C_{22}H_{25}JN_2O_2S$ (508.4) Ber. C 51.97 H 4.96 N 5.51 Gef. C 52.41 H 5.18 N 5.81

Die Verbindung zeigt im IR-Spektrum bei 660/cm eine ausgeprägte SH-Bande.