

Rudolf Tschesche, Lothar Behrendt und Hans-Wolfram Fehlhaber

Alkaloide aus Rhamnaceen, VI¹⁾

Aralionin, ein Peptid-Alkaloid aus *Araliorhamnus vaginatus* Perrier²⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 2. Juli 1968)

Aus den Blättern von *Araliorhamnus vaginatus* Perrier wurde das Hauptalkaloid, Aralionin, isoliert und seine Struktur durch chemischen Abbau und mit Hilfe physikalischer Methoden, insbesondere der Massenspektrometrie, aufgeklärt. Aralionin besitzt ein Ringsystem, aufgebaut aus Phenylserin, *C*-Benzoyl-glycin und *p*-Hydroxy-styrylamin, und als Seitenkette ein *N,N*-Dimethyl-isoleucin (**1**).

Die Massenspektren von **1** und seinen Derivaten (**2**, **3**) zeigen, daß die elektronenstoß-induzierte Fragmentierung von Peptid-Alkaloiden durch funktionelle Gruppen in der Seitenkette einer Aminosäure entscheidend beeinflusst wird.

In Fortführung unserer Arbeiten über die Alkaloide aus Rhamnaceen^{1,3-6)} haben wir die basischen Inhaltsstoffe von *Araliorhamnus vaginatus* Perrier, einem im Südwesten Madagaskars beheimateten Baum, untersucht. Aus einem Methanol-Extrakt von lufttrockenen Blättern dieser Pflanze wurde auf dem üblichen Wege³⁾ eine Rohbasenfraktion gewonnen, aus der sich durch Chromatographie an Kieselgel das Hauptalkaloid, Aralionin, abtrennen ließ. Die Ausbeute betrug, bezogen auf die Rohbasenfraktion, etwa 33%; das sind 0.06% vom eingesetzten Pflanzenmaterial. Gegenüber chemischen und thermischen Einflüssen bewies das Alkaloid eine bemerkenswerte Instabilität; bei längerem Lagern des Rohbasengemisches oder mehrtägigem Aufbewahren einer Chloroform-Lösung von reinem Aralionin zersetzte es sich nahezu quantitativ.

Aralionin besitzt, wie die im folgenden geschilderten Untersuchungen zeigen, die Strukturformel **1**. Es gehört damit zur Gruppe der Peptid-Alkaloide mit einem 14-gliedrigen, durch eine Ätherbrücke geschlossenen Ringsystem, von denen in jüngster Zeit fünfzehn verschiedene Vertreter bekannt geworden sind^{1,3-10)}. Als

¹⁾ V. Mittel.: R. Tschesche und H. Last, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 2993.

²⁾ Auszug aus der Dissertat. L. Behrendt, Univ. Bonn 1968.

³⁾ R. Tschesche, R. Welters und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **100**, 323 (1967).

⁴⁾ R. Tschesche, J. Rheingans, H.-W. Fehlhaber und G. Legler, Chem. Ber. **100**, 3924 (1967).

⁵⁾ R. Tschesche, H. Last und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **100**, 3937 (1967).

⁶⁾ R. Tschesche, E. Froberg und H.-W. Fehlhaber, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 1311.

⁷⁾ M. Pais, F.-X. Jarreau, X. Lusinchi und R. Goutarel, Ann. Chimie **1966**, 83.

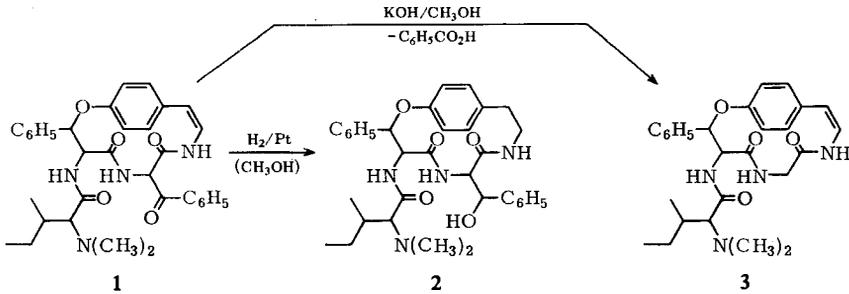
⁸⁾ M. Pais, J. Marchand, X. Monseur, F.-X. Jarreau und R. Goutarel, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **264**, 1409 (1967).

⁹⁾ M. Pais, J. Marchand, F.-X. Jarreau und R. Goutarel, Bull. Soc. chim. France **1968**, 1145.

¹⁰⁾ F. K. Klein und H. Rapoport, J. Amer. chem. Soc. **90**, 2398 (1968).

Besonderheit weist das Aralionin eine *C*-Benzoyl-glycin-Einheit auf, eine unseres Wissens in der Natur bisher nicht aufgefundene Aminosäure.

Die Strukturermittlung stützt sich im wesentlichen auf die Analyse von Hydrolysenprodukten sowie die Anwendung spektroskopischer Methoden beim Aralionin (1), seinem Tetrahydroderivat (2) und dem Abbauprodukt Desbenzoyl-aralionin (3). Ihre Beschreibung sei daher nach diesen drei Verbindungen gegliedert.



Aralionin

Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurde die Summenformel des Aralionins zu $C_{34}H_{38}N_4O_5$ bestimmt. Das IR-Spektrum ähnelt dem anderer Alkaloide dieses Typs: Es lassen sich Banden für sekundäre Amide (3385 und 1675/cm), die *N*-Methyl- (2780/cm), C=C-Doppelbindungs- (1620/cm) und Phenoläther-Gruppierung (1220/cm) zuordnen.

Das UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 246 $m\mu$ (ϵ 19000), das auf den Benzoylrest zurückzuführen ist¹¹⁾. Nach Zugabe von Alkali trat eine starke bathochrome Verschiebung ein (λ_{max} 305 $m\mu$, ϵ 10600), womit das Vorliegen einer zum Benzoylrest β -ständigen Carbonylfunktion angezeigt wurde. Bei dem als Modellsubstanz synthetisierten *N*-Acetyl-*C*-benzoyl-glycin-äthylester¹²⁾ beobachtete man beim Übergang von neutraler zu alkalischer Lösung allerdings eine wesentlich geringere Verschiebung der UV-Absorption (λ_{max} 247 $m\mu$, ϵ 10600 \rightarrow λ_{max} 283 $m\mu$, ϵ 8700). Wahrscheinlich tritt beim Aralionin eine Wechselwirkung zwischen der enolisierten *C*-Benzoyl-glycin-Einheit und dem Styrylamid-System ein, die einen zusätzlichen bathochromen Effekt hervorruft. — Keinerlei Aussagen erlaubt der Circular dichroismus des Aralionins, denn durch die Überlagerung mehrerer Chromophore (Benzoyl-, Styrylamid- und Phenoläther-Gruppierung), möglicherweise auch deren gegenseitige Beeinflussung, entsteht ein komplexes Spektrum mit zahlreichen, teilweise eng benachbarten Extremwerten (s. Versuchsteil).

Im NMR-Spektrum erkennt man die Signale für die beiden *C*-Methylgruppen (τ 9.41 und 9.15) und die Dimethylaminogruppe (τ 7.60). Drei Dubletts bei τ 7.15 ($J = 4.5$ Hz), 5.20 ($J = 8$ Hz) und 4.19 ($J = 6.5$ Hz) dürften den α -ständigen Wasserstoffatomen der *N,N*-Dimethyl-isoleucin-, Phenylserin- bzw. *C*-Benzoyl-glycin-Einheit zuzuschreiben sein. Für die Aromatenprotonen findet sich neben dem üblichen

¹¹⁾ Der Styrylamin-Chromophor dieser Alkaloide liefert wegen der durch das Ringsystem erzwungenen Verdrillung keine selektive UV-Absorption^{3,4)}.

¹²⁾ W. A. Bolhofer, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5459 (1952).

Multipllett bei τ 2.8–3.2 ein weiterer Signalkomplex um τ 2; er stammt von den beiden *ortho*-ständigen H-Atomen der Benzoylgruppe, deren Resonanz durch die Carbonylfunktion eine deutliche paramagnetische Verschiebung erfährt.

Zum qualitativen Nachweis der Aminosäuren wurde Aralionin mit $6n$ HCl bei 110° im Bombenrohr hydrolysiert. Aus dem Reaktionsgemisch ließ sich mit Benzol eine sehr wenig polare, in Wasser unlösliche Substanz abtrennen. Aufgrund der massenspektrometrisch ermittelten Summenformel $C_{16}H_{12}$ und nach einem dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischem Material handelte es sich dabei um β -Phenyl-naphthalin. Dieser Kohlenwasserstoff entsteht unter sauren Bedingungen aus dem sehr empfindlichen Phenylserin^{4,13)} und kann somit als Hinweis auf das Vorliegen dieser Aminosäure dienen. In der wäßrigen Phase des Hydrolysats ließen sich papierchromatographisch *N,N*-Dimethyl-isoleucin und ω -Amino-acetophenon (mittels einer synthetischen¹⁴⁾ Vergleichsprobe) nachweisen. Letzteres wurde außerdem — nach Überführen in das beständigere *N*-Acetylderivat — isoliert und seine Identität durch Vergleich mit authentischem ω -Acetamido-acetophenon¹⁵⁾ gesichert. Das Auftreten von ω -Amino-acetophenon deutete darauf hin, daß Aralionin *C*-Benzoyl-glycin enthält, das als β -Keto-carbonsäure unter den drastischen Hydrolysenbedingungen vollständig decarboxyliert wird und sich damit dem direkten Nachweis entzieht.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen am Aralionin erwiesen sich wegen seiner außerordentlichen thermischen Empfindlichkeit als schwierig. Abbild. 1 zeigt ein unmittelbar nach dem Einführen der Substanz bei einer Ionenquellentemperatur von 160° aufgenommenes Spektrum; schon nach wenigen Minuten beobachtete man starke Veränderungen der Peak-Intensitäten, wobei u. a. die für eine Interpretation sehr wichtigen Peaks m/e 224, 322 und 385 (s. unten) völlig im Spektrenuntergrund verschwanden. Durch systematische Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie — dies erforderte wegen der zeitraubenden *peak matching*-Technik ein wiederholtes Einführen neuer Substanzproben — wurden für zahlreiche Fragment-Ionen die Summenformeln ermittelt (s. Tab. 2 im Versuchsteil) und so deren Zuordnung ermöglicht. Das von uns für Alkaloide dieses Typs aufgestellte Fragmentierungsschema^{4,16)}, das bereits in zahlreichen Fällen eine vollständige Strukturermittlung erlaubte^{1,4-6,9)}, wird beim Aralionin nur teilweise befolgt (soweit dies zutrifft, kennzeichnen wir die Bruchstück-Ionen mit den gleichen Buchstaben wie im allgemeinen Zerfallsschema^{4,16)}).

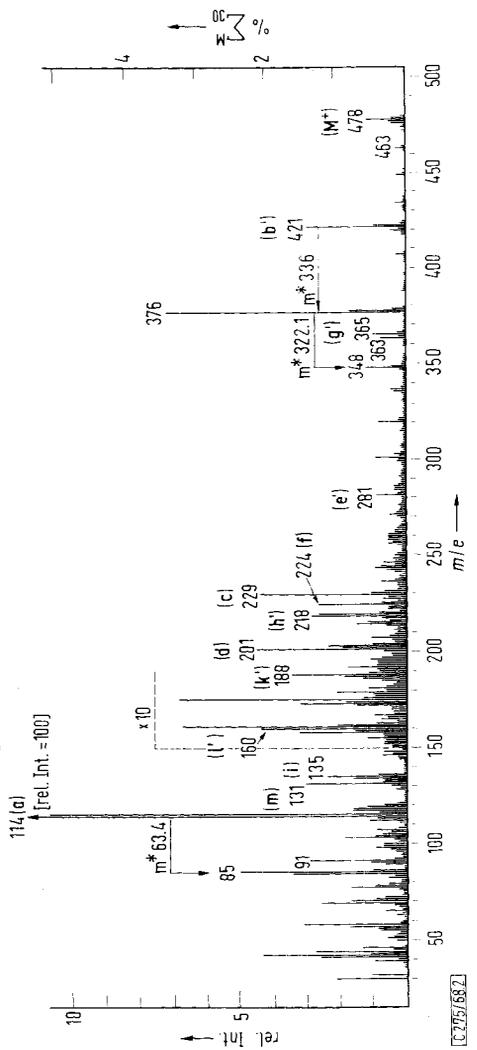
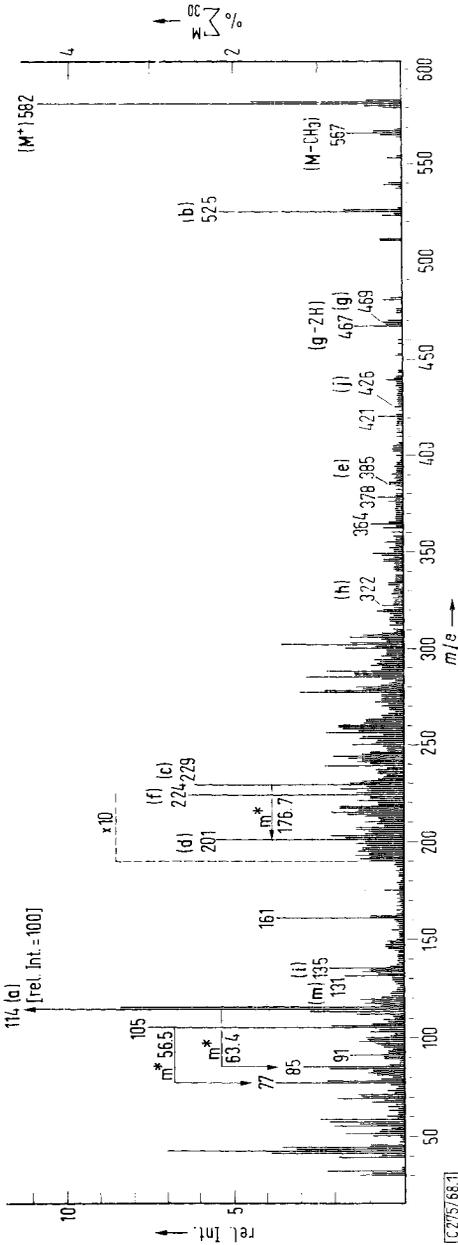
Folgende Fragment-Ionen weisen auf die vier Grundbausteine des Moleküls hin: Das Ion m/e 114 ($C_2H_5-CH(CH_3)-CH=N^+(CH_3)_2$, **a**), dessen durch Abspaltung eines Äthylradikals gebildetes Sekundärfragment m/e 85 ($CH_3-CH=CH-N^+(CH_3)_2$) und das Bruchstück **M** — C_4H_9 (**b**) sind typisch für endständiges *N,N*-Dimethylisoleucin⁴⁾. Der Peak m/e 131, welcher verursacht wird durch ein Cinnamoyl-Ion ($C_6H_5-CH=CH-C\equiv O^+$, **m**), ist auf eine amidartig gebundene und verätherte Phenylse-

¹³⁾ F. Bettzieche, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **150**, 177 (1925).

¹⁴⁾ C. Mannich und F. L. Hahn, Ber. dtsh. chem. Ges. **44**, 1542 (1911).

¹⁵⁾ F. Wolfheim, Ber. dtsh. chem. Ges. **47**, 1440 (1914).

¹⁶⁾ H.-W. Fehlhaber, Z. analyt. Chem. **235**, 91 (1968).

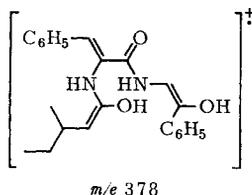
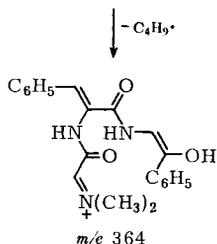
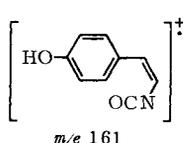
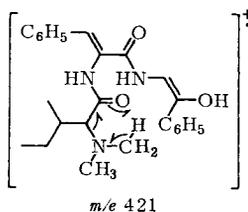
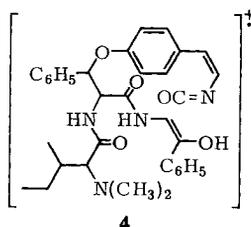
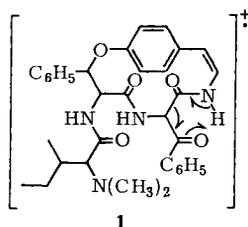
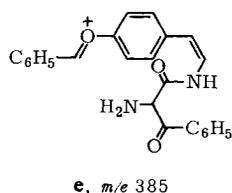
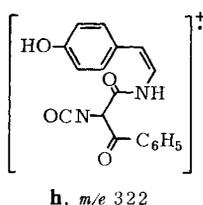
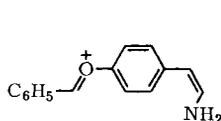
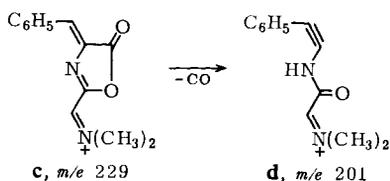


Abbild. 1.
Massenspektrum des Aralioniins (1)

Abbild. 2.
Massenspektrum des Desbenzoyl-aralioniins (3)

rin-Einheit zurückzuführen⁴). Das Fragment m/e 135 ($[\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}_2]^+$, i) belegt das Vorliegen einer Hydroxy-styrylamin-Gruppierung^{4, 16}). Vom C-Benzoyl-glycin läßt sich nur der intensive Peak bei der Massenzahl 105 ableiten, dem aufgrund

des Sekundärerfalls – Eliminierung von CO zu *m/e* 77 – ein Benzoyl-Ion zuzuordnen ist. Das für diese Aminosäure zu erwartende „Aminfragment“^{4,16)}, nämlich $C_6H_5-CO-CH=NH_2^+$ (*m/e* 134), ist nicht eindeutig zu identifizieren, da ein Bruchstück gleicher Summenformel auch vom Hydroxy-styrylamin herrühren kann (*i* – H)^{5,16)}.



Eine Reihe von Bruchstück-Ionen enthält jeweils mehrere dieser Grundeinheiten (oder Teile davon) und erlaubt damit Aussagen über deren Verknüpfung. So beweisen die Fragmente **c** und **d** (siehe Formelschema)¹⁷⁾ die Anknüpfung des *N,N*-Dimethyl-isoleucins an das Phenylserin, und an Hand der Ionen **f**, **h** und **e** erkennt man^{4, 16)}, daß das Phenylserin mit dem Hydroxy-styrylamin veräthert und dieses mit dem *C*-Benzoyl-glycin amidartig verbunden sein muß.

Außer diesen Fragmenten wären nach unseren bisherigen Erfahrungen mit Alkaloiden dieses Typs noch zwei Bruchstück-Ionen zu erwarten, die aus Phenylserin und *C*-Benzoyl-glycin bestehen und deren unmittelbare Verknüpfung belegen (entsprechend **k** und **l** in I. c. 4, 16)). Damit ließe sich — unter Berücksichtigung von **e** — die vollständige Struktur des Ringsystems ableiten. Diese beiden Ionen fehlen beim Aralionin jedoch, wie sich aus den Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie eindeutig ergab.

Statt dessen treten aber einige neue Fragmente auf. Während nämlich bei allen bisher untersuchten Alkaloiden der Zerfall des Ringsystems ausschließlich durch Ringöffnungsreaktionen an der Ätherbrücke eingeleitet wurde^{4, 16)}, kann beim Aralionin aufgrund der Ketofunktion im *C*-Benzoyl-glycin ein weiterer Öffnungsmechanismus ablaufen: Durch eine *McLafferty*-Umlagerung bildet sich das offenkettige System **4**. Die übliche^{4, 16)} Phenoläther-Spaltung¹⁸⁾ führt dann zu den Bruchstücken *m/e* 421 und 161, von denen ersteres durch Abbaureaktionen am *N,N*-Dimethyl-isoleucin — Abspaltung eines Isobutyradikals bzw. Eliminierung von $\text{CH}_2=\text{N}-\text{CH}_3$ — die Ionen *m/e* 364 und 378 liefert. Aus diesen Bruchstück-Ionen ergibt sich nun, daß Phenylserin und *C*-Benzoyl-glycin direkt miteinander verknüpft sind.

Mit diesem Ergebnis ließ sich für Aralionin bereits die Strukturformel **1** aufstellen. Wegen der erwähnten Unsicherheiten bei der Aufnahme des Massenspektrums konnte die diskutierte Fragmentierung allerdings nicht als endgültiger Strukturbeweis angesehen werden¹⁹⁾.

Tetrahydro-aralionin

Bei der katalytischen Hydrierung über Platin in Methanol nahm Aralionin 2 Äquivv. Wasserstoff auf. Das amorphe Reaktionsprodukt erwies sich als noch unbeständiger als Aralionin. Aufgrund der Abwesenheit einer $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindungsbande im IR-Spektrum und der Benzoyl-Absorption im UV-Spektrum sowie nach dem Molekulargewicht von 586 (Massenspektrum) handelte es sich um das Tetrahydroderivat **2**.

Nach einer Hydrolyse des Tetrahydro-aralionins mit 6*n* HCl ließ sich — neben β -Phenyl-naphthalin (vgl. S. 52) und *N,N*-Dimethyl-isoleucin — papierchromatographisch eindeutig Phenylserin nachweisen. Offenbar wird eine Phenylserin-Einheit mit freier Hydroxylgruppe, im Gegensatz zu der als Phenoläther gebundenen, unter

¹⁷⁾ Bezüglich der Formulierung der Ionen **c** und **d** vgl. die früheren Ausführungen^{4, 16)}.

¹⁸⁾ *F. W. McLafferty*, *Analytic. Chem.* **31**, 2072 (1959); *Z. Pelah, J. M. Wilson, M. Ohashi, H. Budzikiewicz und C. Djerassi*, *Tetrahedron* [London] **19**, 2233 (1963).

¹⁹⁾ Auf eine Diskussion dreier in Abbild. 1 markierter Peaks (**g**, **g** — 2H, **j**) wurde verzichtet, da sie, gebildet durch stufenweisen Abbau der *N,N*-Dimethyl-isoleucinamid-Seitenkette, für die Strukturermittlung unwesentlich sind; bezüglich ihrer Formulierung sei auf die früheren Arbeiten verwiesen^{4, 16)}.

den Hydrolysenbedingungen *nicht* vollständig in β -Phenyl-naphthalin umgewandelt²⁰). Dieser Befund sicherte die Annahme, daß vor der Hydrierung, also im Aralionin selbst (I), eine C-Benzoyl-glycin-Gruppierung vorgelegen hatte.

Außerdem wurde im Hydrolysat von 2 *p*-Tyramin identifiziert. Damit war die *p*-Hydroxy-styrylamin-Einheit im Aralionin (I) bewiesen, deren direkter Nachweis durch eine Hydrolyse nicht gelingt.

Die geringe im Hydrolysat zur Verfügung stehende Menge Tyramin erforderte Methoden, die im Mikromaßstab eine Unterscheidung zwischen den drei möglichen Stellungsisomeren²¹) erlauben. Das *ortho*-Isomere ist wegen der Fähigkeit zur Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke erheblich unpolarer als die anderen Isomeren und kann daher in geeigneten papierchromatographischen Systemen leicht erkannt werden²²). Eine sichere Differenzierung zwischen *m*- und *p*-Tyramin aber ist auf diese Weise nicht möglich^{22, 23}). Wir haben uns daher der Tatsache bedient, daß beide Verbindungen bei der Umsetzung mit einem Diazoniumsalz unterschiedlich reagieren: Beim *m*-Tyramin ist eine Verknüpfung in der 4-Stellung (relativ zur phenolischen OH-Gruppe), beim *p*-Tyramin jedoch, da jene blockiert ist, eine Kupplung in der 2-Stellung zu erwarten²⁴). Beide Azofarbstoffe müßten, bedingt durch die ungleiche Länge des mesomeriefähigen Systems, verschiedene UV-Spektren aufweisen²⁵).

Nach einer Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure zeigte der aus *m*-Tyramin entstandene Farbstoff ein selektives UV-Absorptionsmaximum bei 362 m μ , der aus *p*-Tyramin entstandene bei 323 m μ . Das erlaubte eine eindeutige Unterscheidung. Führte man die Reaktion auf Filterpapier aus und eluierte den gebildeten Farbstoff mit Methanol, so erzielte man optimale Ergebnisse mit etwa 25 μ g Phenol-Komponente. Störungen durch gleichzeitig anwesende Aminosäuren traten nicht auf.

Im Massenspektrum des Tetrahydro-aralionins treten einige charakteristische Peaks auf, die auf die Tyramin- und die Phenylserin-Einheit mit freier Hydroxylgruppe zurückzuführen sind. Erstere liefert einen intensiven Peak bei der Massenzahl 120, dem das Fragment p⁴) zuzuordnen ist (siehe Formelschema²⁶). Durch eine *McLafferty*-Umlagerung unter Beteiligung der OH-Gruppe des Phenylserins werden die Bruchstück-Ionen *m/e* 106 und 480 (dieses verursacht den mit Abstand größten Peak oberhalb der Massenzahl 131) gebildet; das Benzaldehyd-Ion *m/e* 106 zerfällt weiter unter stufenweiser Abspaltung eines Wasserstoffradikals und Kohlenmonoxid zu *m/e* 105 und 77. Neben diesem Abbauweg erfolgt auch eine direkte Bindungs-

²⁰) Ähnliche Verhältnisse beobachtete man beim Hydroxyprolin, vgl. *E. Zbiral, E. L. Ménard und J. M. Müller*, *Helv. chim. Acta* **48**, 404 (1965).

²¹) Die neben dem gewöhnlichen Tyramin für diese Versuche benötigten Isomeren, das *o*- und das *m*-Hydroxy- β -phenyl-äthylamin, wurden über die entsprechenden Methoxy- ω -nitro-styrole (a) synthetisiert (b). Literatur: a) *C. B. Gairaud und G. R. Lappin*, *J. org. Chemistry* **18**, 1 (1953); b) *J. Epstein, R. E. Plapinger, H. O. Michel, J. R. Cabb, R. A. Stephani, R. J. Hester, C. Billington jr. und G. R. List*, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 3075 (1964).

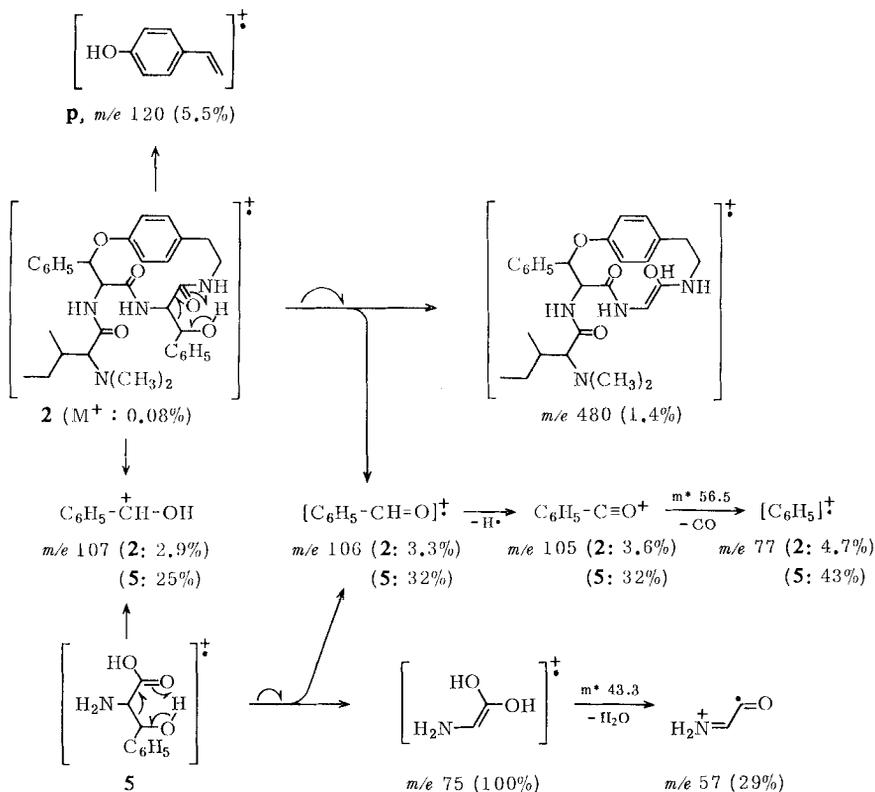
²²) *P. Smith*, *Nature [London]* **195**, 174 (1962).

²³) *Y. Kakimoto und M. D. Armstrong*, *J. biol. Chemistry* **237**, 208 (1962).

²⁴) *K. H. Schünderhütte* in *Methoden der Organ. Chemie* (Houben-Weyl), G. Thieme Verlag, Stuttgart 1965, Bd. X/3, S. 263 und 267.

²⁵) Über die UV-Spektren der isomeren Hydroxy-azobenzole vgl. *R. Kuhn und F. Bär*, *Liebigs Ann. Chem.* **516**, 143 (1935).

²⁶) Die relativen Intensitäten der Ionen sind in Klammern angegeben; sie beziehen sich auf den vom *N,N*-Dimethyl-isoleucin herrührenden, wie üblich^{4, 16}) äußerst intensiven *base peak m/e* 114. Der Peak *m/e* 120 stellt mit 5.5% relativer Intensität den zweitstärksten Peak des Spektrums dar!



spaltung im Phenylserin zum Fragment *m/e* 107²⁷⁾. Ein zum Vergleich aufgenommenes Massenspektrum vom Phenylserin selbst (**5**) zeigte, daß die freie Aminosäure analog fragmentiert: Die *McLafferty*-Umlagerung, die zu den Ionen *m/e* 106 und 75 führt, ist hier eindeutig die Hauptabbaureaktion. Bemerkenswert ist, daß die Peaks *m/e* 77 und 105 bis 107 das gleiche Intensitätsverhältnis zueinander aufweisen wie im Massenspektrum von **2**, ein weiterer Hinweis auf ihre gleichartige Bildungsweise.

– Die nach dem allgemeinen Zerfallsschema^{4,16)} zu erwartenden Fragmente treten gegenüber diesen Reaktionen weitgehend zurück.

Desbenzoyl-aralionin

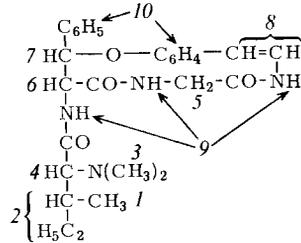
Da die massenspektrometrische Fragmentierung beim Aralionin (**1**) und seinem Tetrahydroderivat (**2**) zum großen Teil von der freien Sauerstofffunktion in der Seitenkette der ringständigen Aminosäure beeinflußt wurde, haben wir versucht, diese zu entfernen oder zu maskieren, um so ein im Sinne des bewährten Zerfallsschemas^{4,16)} auswertbares Massenspektrum und damit einen sicheren Strukturbeweis zu bekom-

²⁷⁾ Die für *m/e* 107 angeführte relative Intensität von 2,9% (bei **2**) dürfte nur teilweise von Ionen der angegebenen Struktur herrühren, denn ein Bruchstück gleicher Summenformel kann auch aus dem Tyramin-Teil des Moleküls gebildet werden ($\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2^+$, Ion **q** in l. c.^{4,16)}).

Tab. 1. NMR-Spektrum des Desbenzoyl-aralionins (3) in CDCl_3 .

Chemische Verschiebung (τ)	Anzahl d. Protonen	Multiplizität *)	Multipl. n. D-Austausch	Zuordnung
9.52	3	d (7 Hz)	d (7 Hz)	1
8.15–9.20	6	m	m	2
7.70	6	s	s	3
7.28	1	d (4.5 Hz)	d (4.5 Hz)	4
6.80	1	dd (17 + 6 Hz)	d (17 Hz)	5
5.88	1	dd (17 + 7 Hz)	d (17 Hz)	
5.39	1	d (7.5 Hz)	s	6
3.51	1	s	s	7
3.64	1	d (7.5 Hz)	d (7.5 Hz)	8
3.31	1	d (7.5 Hz)	d (7.5 Hz)	
um 3.8	3	m	—	9
2.2–3.1	9	m	m	10

*) s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, m = (nicht aufgelöstes) Multipllett.



Durch einen Austausch der NH-Protonen gegen Deuterium (durch mehrstündiges Schütteln der CDCl_3 -Lösung mit D_2O), womit die Signalaufspaltung benachbarter Wasserstoffatome vereinfacht wurde (Spalte 4 in Tab. 1), ließen sich sämtliche Signale zuordnen. Besonders hervorzuheben ist das ABX-Spektrum der Glycin-Einheit: Die Methylenprotonen (5) erfahren, wohl hauptsächlich aufgrund der magnetischen Anisotropie des gegenüber liegenden, zur Ringebene schräg geneigten Benzolringes⁴⁾, eine unterschiedliche diamagnetische Abschirmung und liefern daher zwei um 0.92 ppm auseinander liegende Signale mit einer Aufspaltung von 17 Hz (J_{AB}); beide koppeln außerdem mit dem NH-Proton ($J_{\text{AX}} = 6$ Hz, $J_{\text{BX}} = 7$ Hz). Die beiden Methinprotonen des Phenylserins (6 und 7) zeigen keine gegenseitige Kopplung, offenbar beträgt ihr Dieder-Winkel etwa 90° ; am Molekülmodell ist dies schwer abzuschätzen, da das Ringsystem in gewissen Grenzen flexibel ist. Die vicinale Kopplung der Olefinprotonen (8) von 7.5 Hz beweist das Vorliegen einer *cis*-disubstituierten Doppelbindung; eine Aufspaltung durch die benachbarte NH-Gruppe ist nicht zu beobachten.

Der Circular dichroismus des Desbenzoyl-aralionins unterscheidet sich sehr von dem analoger Peptid-Alkaloide. Anstelle des sehr typischen, stark negativen Cotton-Effekts ($\Delta\epsilon$ um -20) bei etwa $238 \text{ m}\mu$ ^{4,5)} findet man bei $235 \text{ m}\mu$ nur einen relativ schwachen positiven Effekt ($\Delta\epsilon = +3.9$). Damit wird die Annahme gestützt, daß dieser Circular dichroismus vom Styrylamid-Chromophor herrührt und hauptsächlich von der Chiralität der folgenden Aminosäure — im vorliegenden Fall Glycin, das kein asymmetrisches C-Atom aufweist — bestimmt wird.

Herrn Dr. G. Legler danken wir sehr für wertvolle Hinweise, Frau U. Lander und Herrn H. Lander für die geschickte Mitarbeit bei der Aufnahme und Auswertung der Massen- und NMR-Spektren. Den Farbwerken Hoechst AG schulden wir für die Beschaffung der Droge, der Stiftung Volkswagenwerk für die Bereitstellung der Massenspektrometer großen Dank.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach *Weygand*, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 14 bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 (IR), Varian A-60 (NMR), Cary 14 (UV) und Dichrographe 2 von Roussel-Jouan (Circulardichroismus = CD). Die Massenspektren von Aralionin und seinen Derivaten wurden mit dem MS 9 (A. E. I.) durch Einführen der Substanzen direkt in die Ionenquelle bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen; zur exakten Massenbestimmung (s. Tab. 2 und 3) arbeitete man bei einem Auflösungsvermögen von etwa 14000 mit Perfluor-tributylamin als Referenzsubstanz. Das Massenspektrum von Phenylserin (5) wurde mit dem CH 4 (M. A. T.) bei 70 eV und einer Ionenquellentemperatur von ca. 70° (direkte Substanz Einführung) vermessen. — Zur Dünnschicht-Chromatographie benutzte man Kieselgel HF₂₅₄ und PF₂₅₄ (Merck), zur Papierchromatographie die Sorte 2043 bMgl (Schleicher & Schüll) und zur Säulenchromatographie ungesiebtetes Kieselgel (Gebr. Herrmann, Köln).

Gewinnung der Rohalkaloide: 5.4 kg lufttrockene, fein zerkleinerte Blätter von *Aralio-rhamnus vaginatus* Perrier wurden fünfmal mit je 15 l Methanol bei Raumtemperatur extrahiert. Den Auszug engte man i. Vak. bis zur sirupösen Konsistenz ein und verdünnte dann mit der dreifachen Menge Wasser. Diese Lösung wurde durch Zugabe von konz. Ammoniak auf pH 9 eingestellt und viermal mit je 1 l Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten benzolischen Lösungen extrahierte man viermal mit je 1 l 5proz. wäßr. Citronensäure, machte diese dann erneut ammoniakalisch und zog sie erschöpfend mit Chloroform aus. Nach dem Abdampfen des Chloroforms i. Vak. erhielt man 9.3 g (0.17%) *Rohalkaloide* als gelbgrünen Schaum. — Im Dünnschicht-Chromatogramm (Chloroform/Methanol 96 : 4) ließen sich mindestens vier mit Dragendorffs Reagenz²⁹⁾ anfärbbare Komponenten erkennen; die unpolarste davon (R_F 0.7) stellte das Hauptalkaloid Aralionin dar.

Isolierung von Aralionin (1): Jeweils 4.65 g Rohbasengemisch wurden an 1000 g Kieselgel chromatographiert und das Hauptalkaloid mit Chloroform/Methanol (65 : 1) eluiert. Insgesamt erhielt man so 3.1 g *Aralionin* (33%, bez. auf die Rohalkaloide) als leicht gelb gefärbten Schaum. Mehrfache Kristallisation aus Petroläther und anschließend aus wenig 70proz. Äthanol ergab farblose, säulenförmige Kristalle vom Schmp. 165–167°; $[\alpha]_D^{20}$: +82° ($c = 0.2$, Methanol). Mittels hochauflösender Massenspektrometrie wurde die Summenformel zu C₃₄H₃₈N₄O₅ bestimmt (s. Tab. 2).

IR (Chloroform): 3385 (NH), 2780 (NCH₃), 1685–1675 (C=O), 1620 (C=C) und 1220/cm (Phenoläther).

UV (Methanol): λ_{\max} 246 m μ (ϵ 19000); nach Zusatz von methanolischer KOH: λ_{\max} 305 m μ (ϵ 10600), nach etwa 2.5 Stdn. war dieses Absorptionsmaximum verschwunden und es trat ein neues bei 286 m μ auf.

CD (Methanol): $\Delta\epsilon = -0.38$ (322 m μ , Schulter), -2.98 (283 m μ), -2.5 (277 m μ), -4.25 (255 m μ), $+9.25$ (236 m μ), -7.5 (217 m μ), positiv bei kürzeren Wellenlängen.

NMR (CDCl₃): τ 9.41 (d, $J = 7$ Hz, CH₃—C $\overset{\times}{\text{H}}$), 9.15 (m, CH₃—CH₂—), 7.60 (s, —N(CH₃)₂), 7.15 (d, $J = 4.5$ Hz, α -Proton des Me₂Ile), 5.20 (d, $J = 8$ Hz, α -Proton des Phser), 4.19 (d, $J = 6.5$ Hz, α -Proton des 2Bzgly), 3.43 (m), 2.8–3.2 (m, Aromaten), 1.9–2.1 (m, o -Protonen der Benzoylgruppe).

MS (Temperatur der Ionenquelle 160°): s. Abbild. 1 und Tab. 2.

²⁹⁾ R. Munier, Bull. Soc. chim. France 1952, 852.

Tab. 2. Durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformeln für das Aralionin (1)

Ion	Summenformel	Meßwert	Abweichung in mmu *)
M ⁺	C ₃₄ H ₃₈ N ₄ O ₅	582.2834	-0.8
a	C ₇ H ₁₆ N	114.1283	—
b	C ₃₀ H ₂₉ N ₄ O ₅	525.2139	+0.1
c	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₂	229.0976	-0.1
d	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O	201.1030	+0.2
e	C ₂₄ H ₂₁ N ₂ O ₃	385.1546	-0.6
f	C ₁₅ H ₁₄ NO	224.1073	-0.2
g	C ₂₇ H ₂₃ N ₃ O ₅	469.1629	-0.9
g - 2H	C ₂₇ H ₂₁ N ₃ O ₅	467.1479	-0.2
h	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄	322.0950 **)	-0.3
i	C ₈ H ₉ NO	135.0685	+0.1
j	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₄	426.1567	-1.2
m	C ₉ H ₇ O	131.0499	+0.2
m/e 421	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₃	421.2345 ***)	-2.0
m/e 378	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	378.1941 ***)	-0.2
m/e 364	C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₃	364.1661	—
m/e 161	C ₉ H ₇ NO ₂	161.0477	—
m/e 134	C ₈ H ₉ NO	134.0602	-0.4
m/e 105	C ₇ H ₅ O	105.0340	—

*) $\approx 10^{-3}$ Masseneinheiten.

**) Dieses Ion macht etwa 85% der Peak-Intensität bei m/e 322 aus; der Rest besteht aus Bruchstücken anderer Zusammensetzung.

***) Diese Ionen machen etwa 65% der Peak-Intensität aus; der Rest besteht aus Bruchstücken anderer Zusammensetzung.

Hydrolyse des Aralionins: 200 mg 1 wurden mit 5 ccm 6n HCl im Bombenrohr 12 Stdn. auf 110° erhitzt. Nach dem Erkalten extrahierte man das Reaktionsgemisch zehnmal mit je 1 ccm Benzol. Die Benzolphasen wurden vereinigt und i. Vak. zur Trockne gebracht. Im Rückstand wurde massenspektrometrisch (Mol.-Gew. gef. 204.0942; ber. 204.0939 für C₁₆H₁₂) und durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authent. Material (zweimalige Entwicklung in n-Hexan: $R_F = 0.31$) β -Phenyl-naphthalin nachgewiesen.

Die nach der Benzolextraktion verbliebene wäßr. Phase ließ man im Exsikkator über KOH zur Trockne eindunsten und löste den Rückstand in 5 ccm Wasser. Papierchromatographisch wurde darin — durch Vergleich mit authent. Verbindungen — *N,N*-Dimethyl-isoleucin und ω -Amino-acetophenon identifiziert; die benutzten Fließmittelsysteme waren n-Butanol, gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4³⁰⁾, und n-Butanol/Benzylalkohol (1:1), gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4³⁰⁾; es wurde jeweils absteigend mit einer Durchlaufzeit von 22.5 Stdn. gearbeitet.

Zum Hauptteil (4.5 ccm) der obigen wäßr. Lösung gab man unter Eiskühlung 1 ccm Acetanhydrid und trug dann unter Rühren solange NaHCO₃ ein, bis die anfängliche Gasentwicklung beendet war. Dann wurden noch einige Tropfen Acetanhydrid hinzugefügt und weitere 30 Min. unter Eiskühlung gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ sicc. getrocknet. Der nach dem Verjagen des Lösungsmittels i. Vak. erhaltene Rückstand ergab nach Umkristallisieren aus Benzol 10 mg ω -Acetamido-acetophenon vom Schmp. 85.5–86.5° (Lit.³¹⁾; 85.5–86.5°); das IR-Spektrum (in KBr) war identisch mit dem einer authent. Probe¹⁵⁾.

30) E. F. McFarren, Analytic. Chem. **23**, 168 (1951).31) S. Gabriel, Ber. dtsch. chem. Ges. **43**, 1283 (1910).

Tetrahydro-aralioin (2): 100 mg *Aralioin* (1) wurden in 50 ccm Methanol über 100 mg PtO₂ bei Normaldruck und Raumtemperatur hydriert. Nach 12 Stdn. war die *Wasserstoff*-Aufnahme beendet, man filtrierte vom Katalysator ab und dampfte i. Vak. zur Trockne ein. Das Reaktionsprodukt bestand laut Dünnschichtchromatogramm aus drei Verbindungen, die durch präparative Schichtchromatographie im System Chloroform/Methanol (48 : 3) aufgetrennt wurden: Durch Elution der mittleren Zone ($R_F = 0.15$) wurden 80 mg *Tetrahydro-aralioin* als amorphes, nicht kristallisierendes Material erhalten.

MS (Temperatur der Ionenquelle 200°): m/e 586 (M^+).

UV (Methanol): Schultern bei 272, 258 und 230 m μ .

Hydrolyse des Tetrahydro-aralions: 10 mg 2 wurden, wie beim *Aralioin* beschrieben, hydrolysiert und aufgearbeitet. Der Rückstand der wasserlöslichen Anteile des Hydrolysats wurde in 1.5 ccm Wasser aufgenommen, filtriert und zur Papierchromatographie und zur Tyramin-Bestimmung herangezogen.

Durch Vergleich mit authent. Material wurde papierchromatographisch *Phenylserin* nachgewiesen ($R_F = 0.47$ in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5), leichte Phase³²); 0.11 in Äthanol/Wasser (95 : 5)³³); 0.16 in wassergesättigtem Benzylalkohol). Im System *n*-Butanol, gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4³⁰), lieferte das Hydrolysat einen auf Ninhydrin und diazierte Sulfanilsäure ansprechenden Fleck mit dem R_F -Wert 0.37; nach den R_F -Werten von Vergleichsverbindungen — *o*-Tyramin 0.48, *m*-Tyramin 0.39 und *p*-Tyramin 0.36 — handelte es sich dabei um *m*- oder *p*-Tyramin.

Differenzierung von m- und p-Tyramin über die Diazofarbstoffe. a) *Methodik*: Von einer 0.1 proz. wäbr. Lösung von *m*- bzw. *p*-Tyramin wurden jeweils 25 μ l auf Filterpapierstreifen aufgetragen und mit frisch bereitetem Kupplungsreagenz (0.5 g diazierte Sulfanilsäure in 25 ccm 10 proz. Na₂CO₃-Lösung) intensiv eingesprüht. Man ließ 10 Min. an der Luft trocknen und tauchte den Papierstreifen dann 10 Min. in 5 ccm Methanol. Von dieser Farbstofflösung wurde bei 1 cm Schichtdicke ein UV-Spektrum aufgenommen. Man erhielt selektive Absorptionsmaxima bei 362 m μ für *m*-Tyramin und bei 323 m μ für *p*-Tyramin mit einer Extinktion von jeweils etwa 0.5—0.7; bezogen auf die eingesetzte Phenolmenge (25 μ g) entspricht dies einem ϵ von etwa 20000. — Zusatz einer gleichen Gewichtsmenge *N,N*-Dimethyl-isoleucin zur Testlösung veränderte das Ergebnis nicht. — Ein Blindversuch (ohne Phenolkomponente) ergab lediglich eine zu kurzen Wellenlängen steil ansteigende Absorptionskurve ohne selektive Maxima oberhalb 250 m μ .

b) *Anwendung auf das Hydrolysat des Tetrahydro-aralions*: Von der wäbr. Hydrolysenlösung wurden 100 μ l auf Filterpapier aufgetragen und weiterbehandelt, wie unter a) beschrieben. Der gebildete Azofarbstoff lieferte ein UV-Absorptionsmaximum bei 323 m μ ($E = 0.8$).

Desbenzoyl-aralioin (3): Eine Lösung von 200 mg *Aralioin* in 200 ccm Methanol wurde mit 3.5 ccm 0.1 *n* methanol. KOH versetzt und 12 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann engte man i. Vak. auf 10 ccm ein, verdünnte mit Wasser, säuerte mit 2 *n* HCl an und extrahierte mehrmals mit Äther (insgesamt 150 ccm). Aus der äther. Phase erhielt man nach Trocknen und Abdampfen des Lösungsmittels 30 mg öliges Material; nach Umsetzung mit äther. Diazomethan-Lösung konnte darin jedoch kein Benzoessäure-methylester nachgewiesen werden (Gaschromatogramm).

Die salzsaure wäbr. Phase wurde ammoniakalisch gemacht und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösung trocknete man mit Na₂SO₄ sicc. und verjagte das Chloroform i. Vak. Der verbliebene Rückstand enthielt laut Dünnschicht-Chromatogramm

³²) I. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, S. 578, G. Fischer, Jena 1963.

³³) Lit.³²), S. 525.

Tab. 3. Durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformeln für das Desbenzoyl-aralionin (3)

Ion	Summenformel	Meßwert	Abweichung in mmu
M ⁺	C ₂₇ H ₃₄ N ₄ O ₄	478.2564	- 1.6
a	C ₇ H ₁₆ N	114.1282	-0.1
b'	C ₂₃ H ₂₅ N ₄ O ₄	421.1873	-0.3
b' --- HN(CH ₃) ₂	C ₂₁ H ₁₈ N ₃ O ₄	376.1300	+0.3
b' --- HN(CH ₃) ₂ --- CO	C ₂₀ H ₁₈ N ₃ O ₃	348.1345	-0.3
c	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₂	229.0976	-0.1
d	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	201.1028 *)	---
e'	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ O ₂	281.1288	-0.2
f	C ₁₅ H ₁₄ NO	224.1073	-0.2
g'	C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₄	365.1371	-0.4
g' --- 2H	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₄	363.1212	-0.7
h'	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃	218.0694	+0.3
i	C ₈ H ₉ NO	135.0682	-0.2
k'	C ₁₁ H ₁₀ NO ₂	188.0706 **)	-0.5
l'	C ₁₀ H ₁₀ NO	160.0761	-0.1
m	C ₉ H ₇ O	131.0499	+0.2

*) Dieses Fragment macht etwa 85% der Peak-Intensität aus; der Rest wird von Bruchstücken anderer Summenformel gebildet.

**) Dieses Fragment macht etwa 65% der Peak-Intensität aus; der Rest stammt von Bruchstücken anderer Summenformel.

(Chloroform/Methanol 9:1) sechs mit Dragendorffs Reagenz anfärbbare Komponenten. Das Hauptprodukt ($R_F = 0.6$) wurde durch Chromatographie an 100 g Kieselgel durch Gradienten-Elution mit Chloroform/Methanol (1, 2, 4%) abgetrennt. Man erhielt so 73 mg (44% d.Th.) *Desbenzoyl-aralionin* (3). Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther ergab feine Nadeln (48 mg) vom Schmp. 101–104°; $[\alpha]_D^{20}$: +100° ($c = 0.16$, Methanol). Die Summenformel wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie zu C₂₇H₃₄N₄O₄ bestimmt (s. Tab. 3).

IR (Chloroform): 3430 und 3390 (NH), 1685 (Amid-I) und 1225/cm (Phenoläther).

UV (Methanol): Schultern bei 271 (ϵ 3500) und 217 m μ (ϵ 22000).

CD (Methanol): $\Delta\epsilon = -0.26$ (290 m μ), +0.09 (276 m μ), -0.24 (260 m μ), +3.91 (235 m μ), stärker positiv bei kürzeren Wellenlängen.

NMR (CDCl₃): s. Tab. 1 (S. 59).

MS (Temperatur der Ionenquelle 185°): s. Abbild. 2 und Tab. 3.

Hydrolyse des Desbenzoyl-aralionins: 8 mg 3 wurden mit 1 ccm 6*n* HCl im Bombenrohr 12 Stdn. auf 120° erhitzt. Nach dem Abkühlen ließ man das Reaktionsgemisch im Exsikkator über KOH zur Trockne eindunsten und nahm den Rückstand mit 1 ccm Wasser auf. In dieser Lösung ließ sich papierchromatographisch durch Vergleich mit authent. Material *Glycin* nachweisen ($R_F = 0.28$ in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5, leichte Phase³²); 0.04 in wassergesättigtem Benzylalkohol). [275/68]