

Hans Achenbach und Wolfgang Karl

Über die Isolierung von zwei neuen Pyrrolididen aus Rauschpfeffer (*Piper methysticum* Forst.)

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 23. März 1970)

■
Chromatographie des methanolischen Extraktes der Kawa-Wurzel liefert zwei neue Alkaloide, die als Zimtsäure-pyrrolidid und *m*-Methoxy-zimtsäure-pyrrolidid identifiziert wurden. — Damit konnte die umstrittene Frage des Vorkommens von Alkaloiden im Rauschpfeffer eindeutig beantwortet werden.

The Isolation of two New Pyrrolidides from *Piper methysticum* Forst.

Two new alkaloids have been isolated from a methanolic extract of kawa root by chromatography and have been identified to be 1-cinnamoylpyrrolidine and 1-(*m*-methoxycinnamoyl)-pyrrolidine. — Thus, the question of alkaloid content in *Piper methysticum* has been answered undoubtedly.

■
Obwohl sich verschiedene Arbeitsgruppen mit den Inhaltsstoffen des Rauschpfeffers beschäftigt haben¹⁻⁵), konnte der Träger der spezifischen pharmakologischen Wirkung dieser Droge bisher noch nicht eindeutig ermittelt werden.

Interesse verdient unter diesem Aspekt die Tatsache, daß in der Literatur nur vereinzelt über das Vorkommen von Alkaloiden im Rauschpfeffer berichtet wird:

So beschreibt *Winzheimer* die Isolierung einer Stickstoffverbindung, über deren Struktur aber keine Angaben gemacht werden⁶). Die Anwesenheit von Alkaloiden wird später durch *Scheuer* und *Horigan* bestätigt²). Auch hier werden nähere Einzelheiten nicht mitgeteilt.

Die Untersuchungen von *Farnsworth* berechtigen zu einer skeptischen Beurteilung dieser Angaben⁷). Denn *Farnsworth* konnte zeigen, daß die im Rauschpfeffer enthaltenen α -Pyrone mit verschiedenen Alkaloidreagentien alkaloid-positive Reaktionen vortäuschen.

1) *W. Borsche* und *M. Lewinsohn*, Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 1792 (1933).

2) *P. J. Scheuer* und *T. J. Horigan*, Nature [London] **184**, 979 (1959).

3) *M. W. Klohs*, *F. Keller*, *R. E. Williams*, *I. M. Toekes* und *G. E. Cronheim*, J. med. pharmac. Chem. **1**, 95 (1959).

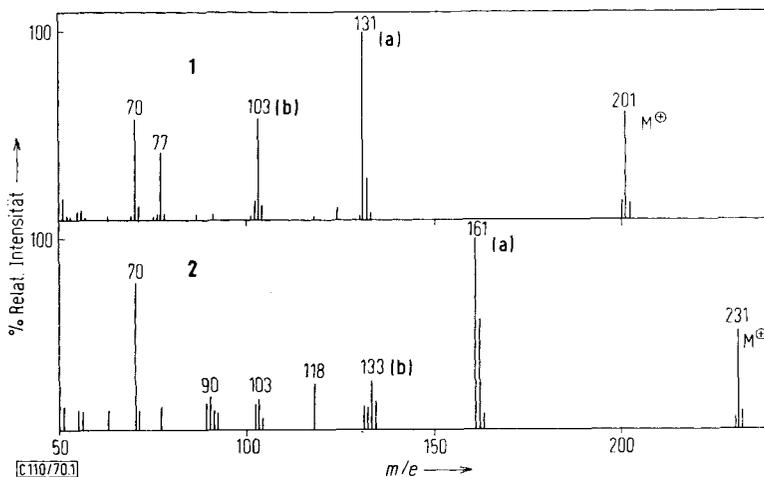
4) *R. Hänse*l und *L. Klaproth*, Arch. Pharmaz. **299**, 503 (1966); *R. Hänse*l, *D. Weiß* und *B. Schmid*, ebenda **301**, 369 (1968).

5) *P. Jössgang* und *D. Molho*, J. Chromatogr. **31**, 375 (1967).

6) *E. Winzheimer*, Arch. Pharmaz. **246**, 338 (1908).

7) *N. R. Farnsworth*, *N. A. Pilewski* und *F. J. Draus*, Lloydia **25**, 312 (1962).

Bei der Chromatographie des Methanol-Extraktes aus Kawa-Rhizom^{*)} isolierten wir zwei Substanzen, **1** und **2**, deren Massenspektren in der Abbild. wiedergegeben sind.



Massenspektren der isolierten Verbindungen **1** und **2**

Beide Substanzen zeigen analoge massenspektrometrische Fragmentierung. Molekül-Ion und typische Bruchstücke erscheinen im Massenspektrum von **2** um 30 ME nach höherer Masse verschoben. **2** sollte sich daher von **1** nur durch eine zusätzliche Methoxylgruppe unterscheiden⁸⁾. Die Informationen aus hochaufgelösten Messungen unterstützen diese Feststellung (Tab.).

Exakte Massen wichtiger Ionen in den Massenspektren von **1** und **2**

Verbindung	nominale Masse	exakte Masse		Zusammensetzung
		gefunden	berechnet	
1	201	201.1163	201.1154	C ₁₃ H ₁₅ NO
	131	131.0501	131.0497	C ₉ H ₇ O
	103	103.0549	103.0548	C ₈ H ₇
	77	77.0387	77.0391	C ₆ H ₅
	70	70.0652	70.0657	C ₄ H ₈ N
2	231	231.1265	231.1259	C ₁₄ H ₁₇ NO ₂
	161	161.0599	161.0602	C ₁₀ H ₉ O ₂
	133	133.0651	133.0653	C ₉ H ₉ O
	103	103.0546	103.0547	C ₈ H ₇
	70	70.0657	70.0657	C ₄ H ₈ N

^{*)} Rhiz. Kawa-Kawa Erg. B. 6, Fa. Caesar u. Loretz, 4010 Hilden.

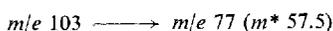
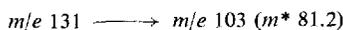
⁸⁾ K. Biemann in Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications, S. 305, MacGraw-Hill, New York 1962.

Aus der Tabelle ergibt sich die elementare Zusammensetzung $C_{13}H_{15}NO$ (für **1**) und $C_{14}H_{17}NO_2$ (für **2**).

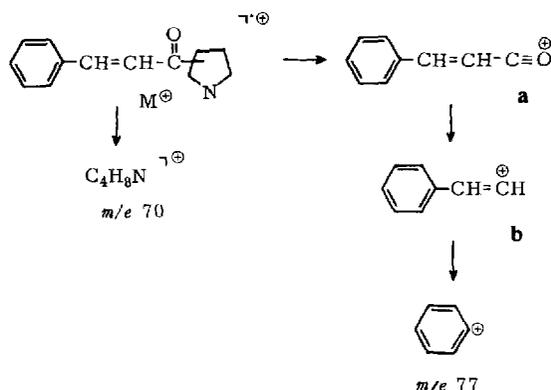
Für die massenspektrometrische Fragmentierung ist charakteristisch die bevorzugte Abspaltung von C_4H_8N aus den Molekül-Ionen (Bruchstück **a**).

Der weitere Zerfall führt in **1** durch sukzessiven Verlust von CO (Bruchstück **b**) und C_2H_2 zu m/e 77 ($C_6H_5^{\oplus}$).

Metastabile Signale bestätigen diesen Zerfallsweg:



Die gemachten Beobachtungen veranlassen zu folgender Formulierung (für **1**):



Die Frage nach der Verknüpfung von Pyrrolidinring und Cinnamoylrest konnte aus den IR-Spektren beantwortet werden. Die niedrige Frequenz der Carbonylabsorption ν_{CO} 1650/cm spricht für das Vorliegen einer Amidbindung⁹⁾.

Bestätigt wurden die Pyrrolidid-Strukturen durch die Massenspektren von **1** und **2** nach versuchtem Deuteriumaustausch: Weder **1** noch **2** enthält austauschbare Protonen.

trans-Stellung an der C=C-Doppelbindung wird angezeigt durch die große Kopplungskonstante ($J = 15.5$ Hz) des AB-Systems der olefinischen Protonen im NMR-Spektrum.

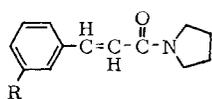
Für **2** fordert die Verschiebung der Fragmente **a** und **b** im Massenspektrum einen methoxylsubstituierten Benzolring.

Das NMR-Spektrum enthält die Signale von insgesamt 4 aromatischen Protonen, die aber kein A_2B_2 -System bilden. Eine *p*-ständige Methoxygruppe kann daher ausgeschlossen werden.

Auch Methoxylsubstitution in *o*-Stellung ist unwahrscheinlich; denn Fragmente aus einem *ortho*-Effekt werden im Massenspektrum von **2** nicht beobachtet.

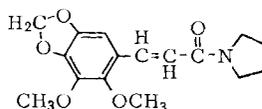
⁹⁾ L. J. Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1966.

Damit ergeben sich für **1** und **2** die Strukturen des Zimtsäure-pyrrolidids (**1**) und des *m*-Methoxy-zimtsäure-pyrrolidids (**2**).



1: R = H

2: R = OCH₃



3

Der Identitätsvergleich mit synthetisiertem Material zeigt sowohl bei **1**¹⁰⁾ als auch bei **2** volle Übereinstimmung.

Diskussion der Ergebnisse

Das Vorkommen von Amiden kann für viele *Piper*-Arten als typisch angesehen werden¹¹⁾.

Mit der Isolierung von **1** und **2** aus Rauschpfeffer (*Piper methysticum*) wurden erstmals Amide auch in dieser Spezies nachgewiesen.

Während sich die meisten bisher in *Piper*-Arten aufgefundenen Amide vom Piperidin oder Isobutylamin ableiten^{11,12,13)}, wurde kürzlich auch über das Vorkommen eines Pyrrolidids (**3**) in *Piper peepuloides* berichtet¹⁴⁾.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Massenspektren wurden mit einem CH₄-Massenspektrometer der Firma Varian-MAT aufgenommen. Ionenquelle: TO₄; Ionisierungsenergie: 70 eV; Einlaßsystem: direkt (Ofeneinsatz).

Die elementare Zusammensetzung von Ionen wurde ermittelt durch ‚Peak-matching‘ mit einem hochauflösenden Massenspektrometer vom Typ SM1-B der Firma Varian-MAT bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 13000$.

Die Registrierung der IR-Spektren erfolgte an KBr-Preßlingen mit einem IR-Spektralphotometer IR 10 der Firma Beckman. UV-Spektren in 96proz. Äthanol wurden aufgenommen mit einem Spektralphotometer DMR 21 der Firma Carl Zeiss.

Die ¹H-NMR-Spektren erhielten wir mit einem Varian-Kernresonanzspektrometer A-60 A; Lösungsmittel: Deuteriochloroform; innerer Standard: Tetramethylsilan.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Platten, beschichtet mit Kieselgel H (Fa. Merck); Schichtdicke: 0.25 mm. Die Platten wurden vor der Aktivierung mit Methanol gewaschen. Sichtbarmachung der Substanzen erfolgte mit Joddampf. Für die Gaschromatographie stand ein Gaschromatograph der Baureihe 5750 (Firma Hewlett und Packard) zur Verfügung; Detektor: WLD.

¹⁰⁾ L. Turbanti, G. Cerbai, G. Bramanti, P. Bianchini und N. Tellini, Chim. Ther. **2**, 354 (1967).

¹¹⁾ R. Hegnauer in Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 5, S. 314, Birkhäuser Verlag, Basel 1969.

¹²⁾ J. W. Loder, A. Moorhouse und G. B. Russel, Austral. J. Chem. **22**, 1531 (1969).

¹³⁾ S. Takahashi, M. Kurabayashi, A. Ogiso und H. Mishima, Chem. pharmac. Bull. **17**, 1225 (1969), C. A. **71**, 70267 g (1969).

¹⁴⁾ C. K. Atal und P. N. Moza, Tetrahedron Letters [London] **1968**, 1397.

Aufarbeitung des Pflanzenmaterials: 2.25 kg Rhizoma Kawa-Kawa, Erg. B. 6, wurden pulverisiert und im Soxhlet mit Äther erschöpfend extrahiert. Der eingedampfte Ätherauszug hinterließ einen Rückstand von 105 g.

Die Droge wurde anschließend in 4 l Methanol suspendiert und unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 5 Tagen wurde abfiltriert und in 4 l frischem Methanol für wiederum 5 Tage suspendiert. Diese Kaltextraktion wurde noch 4 mal wiederholt.

Die vereinigten Methanolextrakte engten wir im Rotationsverdampfer (Wasserbad, 40°) ein. Der sirupöse Rückstand (68 g) wurde, in Chloroform suspendiert, auf eine Säule aufgegeben, die mit 600 g Kieselgel (<100 mesh, Fa. Mallinckrodt) gefüllt war. Eluiert wurde mit 2.5 l Chloroform, dann mit je 500 ccm Chloroform/Methanol in steigender Konzentration (1%, 2%, 5%, 10%, 20%, 50%). Man erhielt 100 Fraktionen A von jeweils 50 ccm. Die vereinigten Fraktionen A 62 bis A 71 befreiten wir durch Schütteln mit Natriumhydrogencarbonatlösung von sauren Bestandteilen und engten im Rotationsverdampfer zur Trockne ein. Den Rückstand (4.1 g) chromatographierten wir erneut an 70 g Kieselgel (<100 mesh, Fa. Mallinckrodt).

Elution mit Chloroform ergab 130 Fraktionen B von jeweils 7.5 ccm.

Isolierung von 1: Die vereinigten Fraktionen B 85 bis B 102 hinterließen beim Einengen 470 mg Rückstand, der in wenig Chloroform gelöst und auf 35 vorgewaschene Dünnschichtplatten (200 mm) aufgetragen wurde. Zur Entwicklung diente das Gemisch Benzol/Essigsäure-äthylester/Methanol (60 : 35 : 2 v/v/v). Die Zone mit R_F 0.21 bis 0.25 enthielt 49 mg 1 (noch schwach verunreinigt mit 2).

Die Reinigung erfolgte gaschromatographisch an Chromosorb W (AW/DMCS), belegt mit 2% Silikongummi SE 30 (Säulenlänge: 2 m); Trägergas: He; Strömungsgeschwindigkeit: 58 ccm/Min.; Einspritztemperatur: 150°; Programmierung 15°/Min.; Endtemperatur: 280°. 1 erscheint bei 232° nach 330 Sek. und wurde in einer Kühlfalle aufgefangen.

MS: 201.1163 (M^{\oplus} C₁₃H₁₅NO).

IR: ν_{CO} 1650/cm.

UV: λ_{max} 280.5 nm.

1 war in allen geprüften Eigenschaften (MS, IR, NMR, GC) identisch mit synthetisiertem *Zimtsäure-pyrrolidid*.

Isolierung von 2: Aus den Dünnschichtplatten wurde die Zone mit R_F 0.17 bis 0.20 mit Chloroform und Methanol extrahiert. Es fielen 47 mg 2 an (noch schwach verunreinigt mit 1). Reinigung erfolgte durch Gaschromatographie unter den angegebenen Bedingungen. 2 erscheint bei 255° nach 420 Sek. und wurde in einer Kühlfalle aufgefangen. (Unter diesen GC-Bedingungen haben *o*- und *m*-Methoxy-zimtsäure-pyrrolidid gleiche Retentionszeiten, während die Retentionszeit des *p*-Isomeren größer ist.)

MS: 231.1265 (M^{\ominus} C₁₄H₁₇NO₂).

IR: ν_{CO} 1648/cm.

UV: λ_{max} 310 nm.

2 war in allen geprüften Eigenschaften (MS, IR, NMR, GC) identisch mit synthetisiertem *m*-Methoxy-zimtsäure-pyrrolidid.

Zimtsäure-pyrrolidid (1): 22.2 g *Zimtsäure* werden mit 35.7 g *Thionylchlorid* 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend zieht man überschüssiges *Thionylchlorid* i. Vak. ab und versetzt den Rückstand in 25 ccm trockenem Dioxan unter Eiskühlung tropfenweise mit 15 g

Pyrrolidin. Nach 30 Min. werden 100 ccm Wasser zugegeben, mit 0.5*n* HCl auf pH 2 eingestellt und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte werden mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Petroläther (60–80°) ergibt farblose Nadeln vom Schmp. 101–103° (Lit.¹⁰): 101–102°. Ausb. 15 g (51 %).

m-Methoxy-zimtsäure-pyrrolidid (2): Wie vorstehend erhielten wir aus 25.8 g *m*-Methoxy-zimtsäure und 35.7 g Thionylchlorid ein Produkt, das nach Umkristallisieren aus Petroläther (60–80°) in Nadeln mit Schmp. 90–93° anfiel. Ausb. 16 g (48 %).

[110/70]