

*Jürgen Friedrich-Fiechtl und Gerhard Spiteller*

Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, X<sup>1)</sup>

## Neue Alkaloide aus *Erythrophleum guineense* und über das Muawin

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 16. Juli 1971)

Aus der Rinde von *Erythrophleum guineense* wurde als Hauptkomponente das bisher unbekannte Alkaloid Norcassamin (**4**) isoliert. Als weiteres Hauptalkaloid enthält die Rinde Norcassamidin (**7**). Es ist mit dem schon früher in der gleichen Droge aufgefundenen Erythrophlein, dem allerdings eine andere Struktur zugeschrieben wurde, identisch<sup>2)</sup>. Die Strukturen von zwei Nebenalkaloiden Norerythrosuamin (**10**) und Dehydro-norerythrosuamin (**12**) konnten mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt werden. — Das ursprünglich als einheitliches Alkaloid angesehene „Muawin“<sup>3)</sup> ist ein Substanzgemisch, das die gleichen Alkaloide wie die hier beschriebene Droge enthält. Der Name ist daher aus der Literatur zu streichen.

### Application of Mass Spectrometry on the Structure Elucidation of Alkaloids, X<sup>1)</sup>

#### New Alkaloids from *Erythrophleum guineense* and about Muawin

From the bark of *Erythrophleum guineense* the so far unknown alkaloid norcassamine (**4**) was isolated as main product. The bark contains as second main alkaloid norcassamidine (**7**), identical with the already earlier in the same drug detected erythrophleine<sup>2)</sup>. Its originally ascribed structure<sup>2)</sup> should be revised. The structures of two minor alkaloids, norerythrosuamine (**10**) and dehydro-norerythrosuamine (**12**) were clarified with the aid of mass spectrometry. — „Muawin“<sup>3)</sup>, originally regarded to be a single compound, is a mixture containing the same alkaloids as the drug described here. Therefore the name should be canceled.

### Einleitung

Alkaloide der *Erythrophleum*-Arten übertreffen die Digitalis-Steroidglykoside hinsichtlich ihrer pharmakologischen Wirksamkeit noch erheblich<sup>4)</sup>. Sie gehören, wie heute bekannt ist, alle dem gleichen Strukturtyp A eines Diterpens an<sup>5)</sup> und unterscheiden sich voneinander nur durch verschiedenartige Substitution am Kohlenstoffatom 4, am Aminstickstoff und der Art und Stellung von Sauerstoffsubstituenten im A/B-Ringsystem.

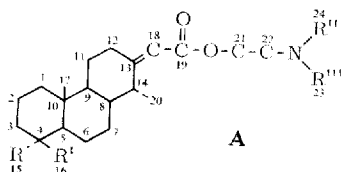
<sup>1)</sup> IX. Mitteil.: M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Liebigs Ann. Chem. **712**, 179 (1968).

<sup>2)</sup> B. K. Blount, H. T. Openshaw und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1940**, 286.

<sup>3)</sup> H. Jacobson, Untersuchungen über Muawin, Dissertation, Univ. Dorpat 1892.

<sup>4)</sup> R. H. F. Manske, The Alkaloids, Bd. V, S. 101—107, Academic Press Inc., Publishers, New York 1955; H. Y. Portius und K. Repke, Arzneimittel-Forsch. **14**, 1073 (1964).

<sup>5)</sup> R. H. F. Manske, The Alkaloids, Bd. X, S. 289, Academic Press Inc., Publishers, New York 1968.

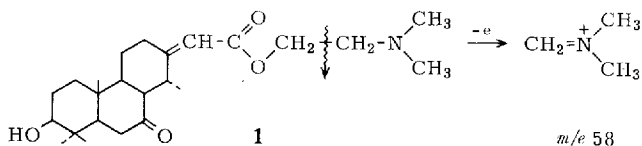


Aus der Rinde des in Mozambique beheimateten Muawi-Baumes, einer nicht näher bezeichneten Subspezies der weitverbreiteten Art *Erythrophleum guineense*, isolierte *E. Merck* 1891 das „Muawin“<sup>6)</sup>. Dr. *Seitz* von der Firma *Merck* stellte uns eine noch vorhandene Probe dieses „Muawins“ für eine Strukturaufklärung zur Verfügung. Es war zu vermuten, daß das unbekannte Muawin ebenfalls eine Verbindung vom Strukturtyp **A** darstellt.

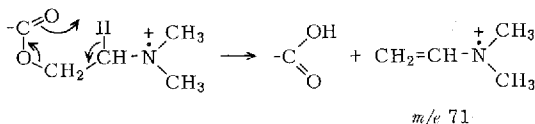
Zur Untersuchung von Verbindungen gleichen Skeletts hat sich die Massenspektrometrie sehr bewährt, da häufig bei Anwesenheit von Substituenten gleichartige Spaltreaktionen ablaufen und nur eine Verschiebung der Schlüsselbruchstücke um die Substituentenmasse eintritt<sup>7)</sup>. Bisher wurden die Massenspektren von Erythrophleum-Alkaloiden noch nicht eingehend studiert — lediglich zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde die Methode herangezogen<sup>8)</sup>. Um Vergleichsmaterial zu bekommen, untersuchten wir das Spektrum des Cassains (**1**)<sup>9)</sup>.

#### Das Massenspektrum des Cassains (**1**)

Das Spektrum des Cassains (**1**) (Abbild. 1) ist durch außerordentlich intensive Ionen der Masse 58 und 71 gekennzeichnet. Die Ionen der Masse 58 entstehen durch die für Amine übliche Spaltung der dem N-Atom benachbarten C—C-Bindung:



Das Ion der Masse 71 wird offenbar im Zuge einer vom Ladungszentrum unabhängigen McLafferty-Umlagerung gebildet und stellt somit ein Beispiel für eine „quasithermische Reaktion“ dar, deren Existenz kürzlich in Zweifel gestellt worden war<sup>10)</sup>:



Im Zuge einer weiteren Abbaureaktion wird die Seitenkette eliminiert, so daß ein stabiles Acylcarbonium-Ion **M** — 88 entsteht:

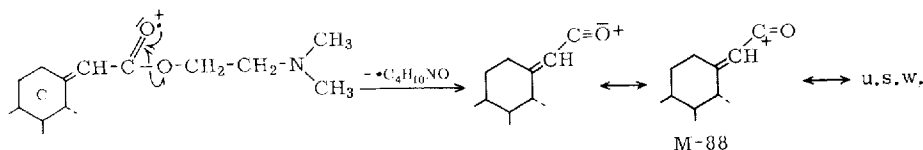
6) *E. Merck*, Jahresbericht, Jan. 1891.

7) *K. Biemann*, Tetrahedron Letters [London] **1960**, 15.

8) *A. Thorell*, *S. Agurell* und *F. Sandberg*, Acta chem. scand. **22**, 2835 (1968).

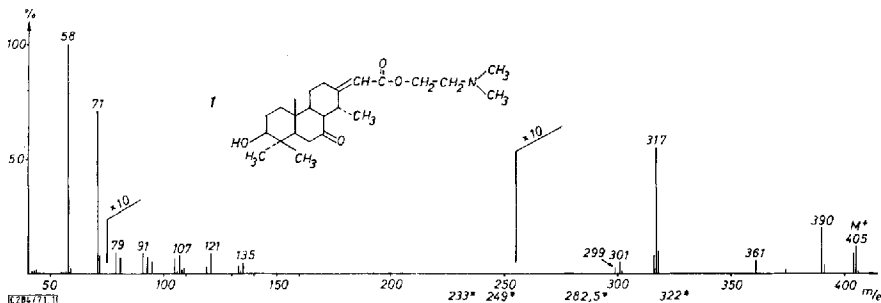
9) Für die Vergleichsproben danken wir Dr. *G. Seitz* von der Fa. *E. Merck AG* in Darmstadt.

10) *H. Bruderer*, *W. Richter* und *W. Vetter*, Helv. chim. Acta **50**, 1917 (1967).

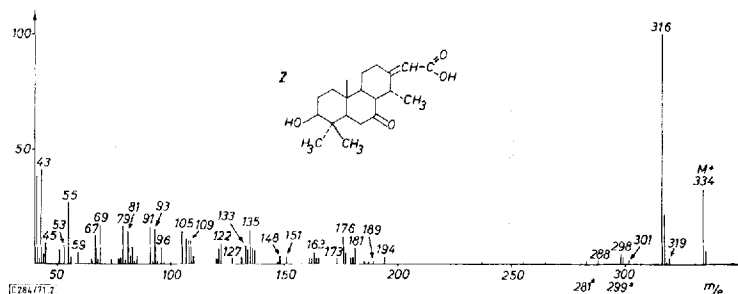


Schlüsselbruchstücke, die auf die Struktur des Säureteiles schließen ließen, fehlen dagegen.

Nach Kenntnis des Cassain-Spektrums kann man daher erwarten, daß die Massenspektrometrie bei der Strukturaufklärung unbekannter Alkaloide der *Erythrophleum*-Arten nur zur Bestimmung der basischen Esterkomponente beitragen kann.

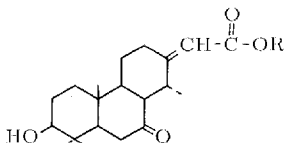


Abbild. 1. Massenspektrum des Cassains (1)



Abbild. 2. Massenspektrum der Cassainsäure (2)

Um zu sehen, ob Informationen über die Struktur des Säureteils erhältlich sind, wurde das Spektrum der Cassainsäure (2) aufgenommen (Abbild. 2). Es ist ebenfalls arm an Bruchstücken, lediglich das M - 18-Ion ist von überragender Intensität. Somit bietet in diesem Fall die Verseifung der Verbindung keine Vorteile.



1: R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$

2: R = H

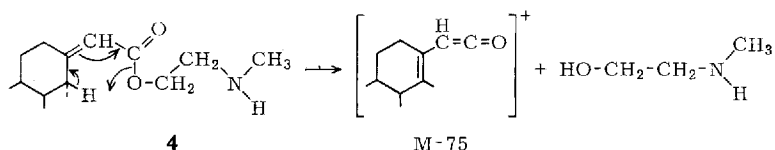
## I. Untersuchung des Muawins

Ein Massenspektrum des Muawins zeigte, daß die Droge offenbar ein Gemisch war, das aus Hauptkomponenten der Masse 419, 421, 433 und 435 bestand. Orientierende

dünnschichtchromatographische Untersuchungen bestätigten diese Vermutung. Das Gemisch wurde daher nach säulenchromatographischer Vortrennung durch präparative Dünnschichtchromatographie in einzelne Komponenten zerlegt.

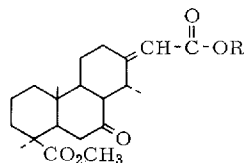
### 1. Norcassamin (4)

Das Massenspektrum der Base  $C_{24}H_{37}NO_5$  (Abbild. 3) unterschied sich erheblich von dem des Cassains (1) (Abbild. 1). Schlüsselbruchstücke der Masse 58 und 71 fehlten fast völlig. Ein  $M-74$ -Ion, begleitet von einem um eine Masseneinheit leichteren Ion, zeigte den Verlust von  $C_3H_8NO\cdot$  an und entsprach dem  $M-88$ -Fragment im Spektrum des Cassains. Die Bildung des  $M-75$ -Ions ist durch Verlust von *N*-Methylaminoäthanol — wahrscheinlich als Folge einer McLafferty-Umlagerung — zu deuten:



Somit sollte in der Esterkomponente der unbekanntenen Verbindung eine der Methylgruppen am Stickstoffatom durch Wasserstoff ersetzt sein. Diese Vermutung wurde durch das Kernresonanzspektrum gestützt, das eine *N*-Methylaminogruppe (Singulett bei  $\delta$  3.07) zeigte.

Die Verseifung ergab eine Säure vom Schmp.  $218^\circ$  mit der durch Hochauflösung bestimmten Bruttoformel  $C_{21}H_{30}O_5$ . Drehung und Vergleich der IR-Spektren erwiesen die Identität mit der Cassaminsäure (3)<sup>11)</sup>. Demnach mußte es sich bei dem Alkaloid um das bisher unbekanntene Norcassamin (4) handeln.

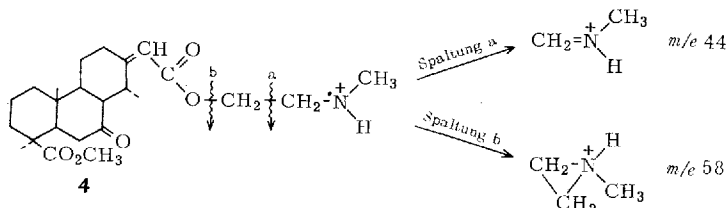


3: R = H

4: R =  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_3$

5: R =  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)}_2$

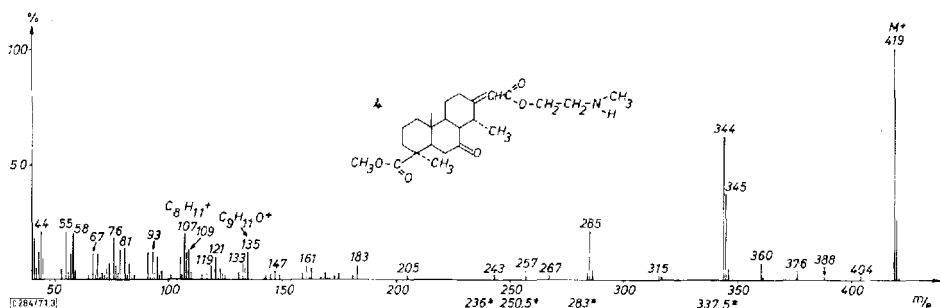
Dieser Befund gestattete auch eine bessere Interpretation des Massenspektrums (Abbild. 3). Hervorzuheben ist vor allem die gegenüber dem Cassain stark verminderte Neigung zur Bildung von Aminfragmenten durch Spaltung der dem Stickstoffatom benachbarten C—C-Bindung:



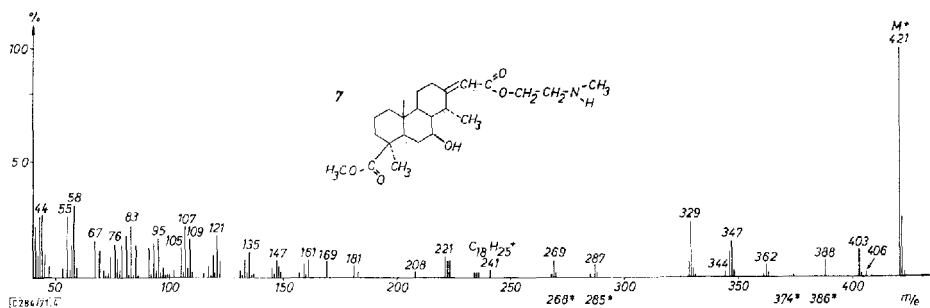
<sup>11)</sup> V. P. Arya und B. G. Engel, *Helv. chim. Acta* **44**, 1650 (1961).

Das Ion der Masse 44 erreicht nur mittlere Intensität. Bemerkenswert ist die ebenso starke Tendenz zur Spaltung der zum Stickstoff  $\beta$ - $\gamma$ -ständigen C—O-Bindung; Sie ist offenbar darauf zurückzuführen, daß das bei dieser Reaktion entstehende Sauerstoffradikal gegenüber Kohlenstoffradikalen eine erhöhte Stabilität besitzt und somit der Gesamtenergiebedarf dieser Reaktion durchaus mit der Bildung des Aminfragmentes der Masse 44 zu konkurrieren vermag. Ist hingegen durch eine Dimethylaminogruppe die negative Ladungsdichte am Stickstoff erhöht, so ist wie im Cassain die Bildung des Aminfragmentes stärker begünstigt.

Aus der verhältnismäßig geringen Intensität der durch primäre Ionisation am Stickstoff entstehenden Fragmente (Ionen der Masse 44 und 58) ist der Schluß zu ziehen, daß das in der Verbindung vorhandene ungesättigte Carbonylsystem des Terpenteiles eine in etwa gleiche Ionisierungswahrscheinlichkeit wie ein dialkylsubstituiertes N-Atom aufweist und erst bei Verstärkung der negativen Ladungsdichte am Stickstoff durch Einführung einer weiteren Methylgruppe eine zur einseitigen Bruchstückbildung ausreichende Ionisierung am Stickstoff erfolgt, so daß dann die Bruchstückbildung wie im Falle des Cassains ganz zugunsten stickstoffhaltiger Fragmente verschoben ist.



Abbild. 3. Massenspektrum des Norcassamins (4)



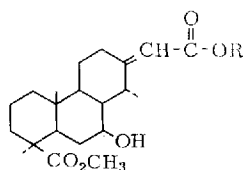
Abbild. 4. Massenspektrum des Norcassamidins (7)

Das Vorhandensein der Methoxycarbonylgruppe ist an einem Ion der Masse 285  $C_{19}H_{25}O_2$  erkennbar, das wahrscheinlich aus dem  $M - 75$ -Fragment durch Eliminierung von  $\cdot COOCH_3$  entsteht.

## 2. Norcassamidin (7)

Eine weitere Base zeigte im Massenspektrum das Molekulargewicht 421. Durch Hochauflösung ergab sich die Bruttoformel  $C_{24}H_{39}NO_5$ , die Base war also um 2 Wasserstoffatome reicher als das Norcassamin (4). Schlüsselbruchstücke der Masse 44 und 58, sowie bei  $M - 74$  und  $M - 75$  wiesen (siehe Spektrum des Norcassamins, Abbild. 3) auf das Vorhandensein einer *N*-Methyl-aminoäthanolgruppe als Esterkomponente hin (Abbild. 4). Das Ion der Masse 287 entsprach der Summenformel  $C_{19}H_{27}O_2$  und sollte somit aus dem Bruchstück der Masse 346 durch Verlust einer Methoxycarbonylgruppe entstanden sein. Dieser Befund ließ den Schluß zu, daß wie im Norcassamin eine Methoxycarbonylgruppe im Molekül enthalten war. Ein  $M - 18$ -Ion machte das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe wahrscheinlich. Wenn man dazu in Betracht zieht, daß das Molekulargewicht der Base um 2 ME höher ist als das des Norcassamins (4), kommt man zu dem Schluß, daß möglicherweise in der Base vom Mol.-Gew. 421 die CO-Gruppe des Norcassamins zur Hydroxylgruppe hydriert ist. Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Verseifung, die Cassamidinsäure (6) ergab<sup>11)</sup>.

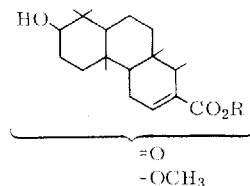
Zur weiteren Strukturbestätigung wurde das Norcassamin (4) mit  $NaBH_4$  reduziert. Wie durch  $NaBH_4$ -Reduktion des Cassains zu Cassaidin<sup>12)</sup> und Cassamin zu Cassamidin<sup>11)</sup> bekannt ist, wird hierbei der stabilere äquatoriale Alkohol gebildet<sup>13, 14)</sup>. Bei der  $NaBH_4$ -Reduktion des Norcassamins entstand eine in allen Eigenschaften mit dem Naturprodukt identische Base. Somit ist die Stereochemie der Hydroxylgruppe im Norcassamidin, nämlich in  $\beta$ -Stellung, festgelegt. Dem Norcassamidin kommt daher die Struktur 7 zu.



6: R = H

7: R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$

8: R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$



9: R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$

(nach Lit. 2<sup>1)</sup>)

Beim Norcassamidin handelt es sich offenbar um das von *Blount*, *Openshaw* und *Todd* beschriebene Erythrophlein<sup>2)</sup>, dem die Autoren allerdings eine andere Struktur zugeschrieben haben (9): Jener Arbeitsgruppe stand ein Merck-Präparat „Erythrophleinsulfat“ zur Verfügung. Bei der Untersuchung einer ebenfalls von der Fa. Merck stammenden Droge „Erythrophleinsulfat“<sup>9)</sup> stellten wir fest, daß es sich um ein Basengemisch mit ähnlicher Zusammensetzung handelt, wie im Rindenextrakt und im Muawin.

<sup>12)</sup> B. G. Engel, *Helv. chim. Acta* **42**, 1127 (1959).

<sup>13)</sup> W. G. Dauben, E. J. Blanz jr., J. Jiu und R. A. Micheli, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3752 (1956).

<sup>14)</sup> Siehe Lit. 11<sup>1)</sup>, S. 1660.

### 3. Cassamin (5)

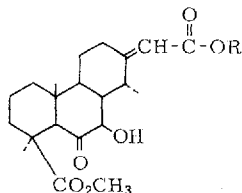
In kleiner Menge konnte das bereits früher in *Erythrophleum guineense* aufgefundene Alkaloid Cassamin (5)<sup>15</sup> nachgewiesen werden: Das Massenspektrum zeigte erwartungsgemäß Ionen extrem hoher Intensität der Masse 58 und 71. Die Bruttoformel wurde durch Hochauflösung zu  $C_{25}H_{39}NO_5$  bestimmt. Nach der Verseifung wurde eine Säure  $C_{21}H_{30}O_5$  erhalten, die in allen ihren physikalischen und spektroskopischen Eigenschaften mit der bereits früher bekannten Cassaminsäure übereinstimmte.

### 4. Norerythrosumin (10)

In kleiner Menge konnte eine nicht kristallisierende Verbindung vom Molekulargewicht 435 isoliert werden, der die Bruttoformel  $C_{24}H_{37}NO_6$  zukam.

Das Massenspektrum zeigte mit Schlüsselbruchstücken bei  $M-74$  und  $M-75$  sowie der Masse 44 und 58 die Gegenwart einer Methylaminoäthanolgruppe als Esterkomponente an (Abbild. 5). Das Ion der Masse 301 ( $C_{19}H_{25}O_3$ ) mußte aus dem Ion der Masse 360 durch Verlust von  $CH_3O-C=O$  gebildet worden sein und sprach somit für die Anwesenheit einer Methoxycarbonylgruppe in der Stellung 4.

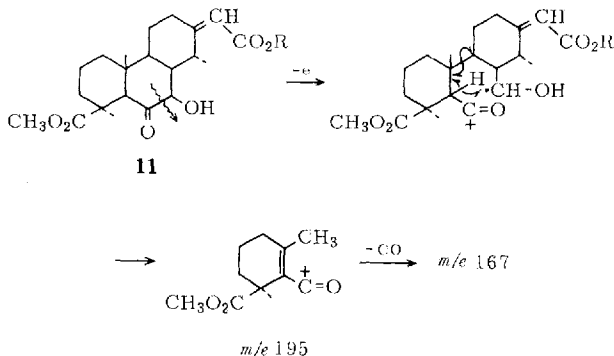
Bei der Verseifung wurde eine Säure erhalten, die in allen ihren Eigenschaften mit Erythrosuminsäure (11) übereinstimmte. Bei der Base vom Molekulargewicht 435 muß es sich also um das Norerythrosumin (10) handeln.



10: R =  $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$

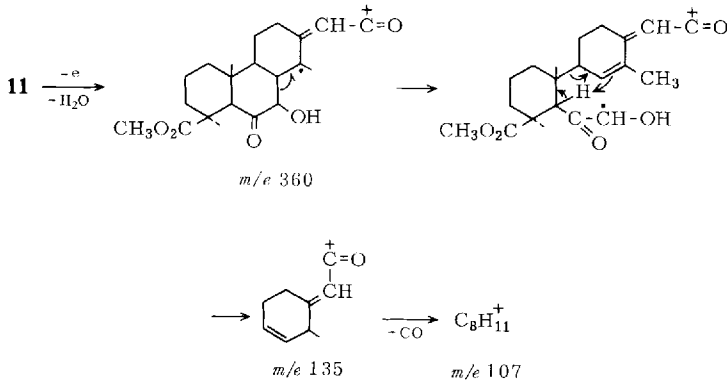
11: R = H

Bemerkenswert charakteristisch ist das Massenspektrum der Säure 11 (Abbild. 6), das durch intensive Ionen der Masse 195 ( $C_{11}H_{15}O_3$ ), 167 ( $C_{10}H_{15}O_2$ ), 135 ( $C_9H_{11}O$ ) und 109 ( $C_8H_{13}$ ) gekennzeichnet ist. Offensichtlich ermöglicht die Acyloingruppe bevorzugte Spaltungsreaktionen an der Bindung zwischen C-6 und C-7:

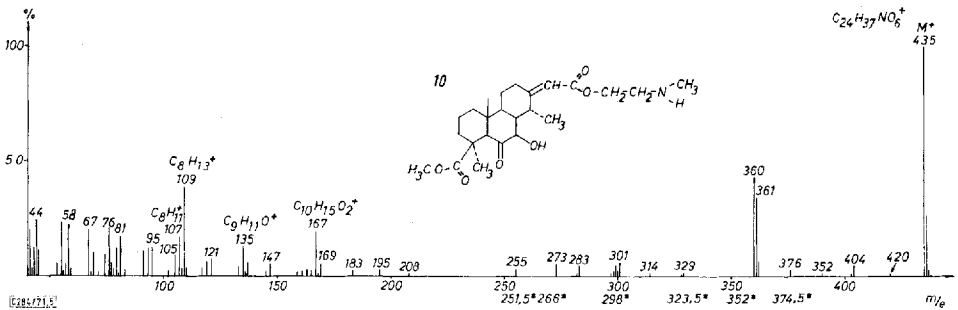


<sup>15</sup> B. G. Engel und R. Tondeur, *Experientia* [Basel] **4**, 430 (1948); *Helv. chim. Acta* **32**, 2364 (1949).

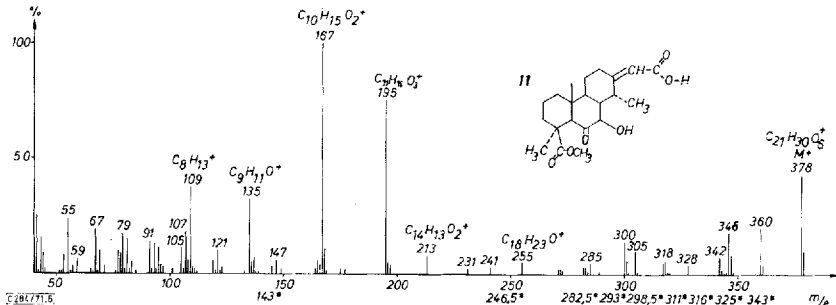
In der Folge muß es dann zu einer Wasserstoffverschiebung an das radikalische Zentrum kommen, wodurch das Schlüsselfragment der Masse 195 entsteht, das dann zum Ion der Masse 167 weiterzerfallen kann. Das Ion  $C_9H_{11}O$  enthält die Kohlenstoffatome des Ringes C. Seine Bildung könnte aus dem Wasserabspaltungsprodukt der Masse 360 in folgender Weise abgeleitet werden:



Analoge Bruchstücke finden sich auch in den Spektren der anderen Säuren und Alkaloide, doch ist ihre Intensität viel geringer und ihr Aussagegewicht daher nur gering.



Abbild. 5. Massenspektrum des Norerythrosumins (10)

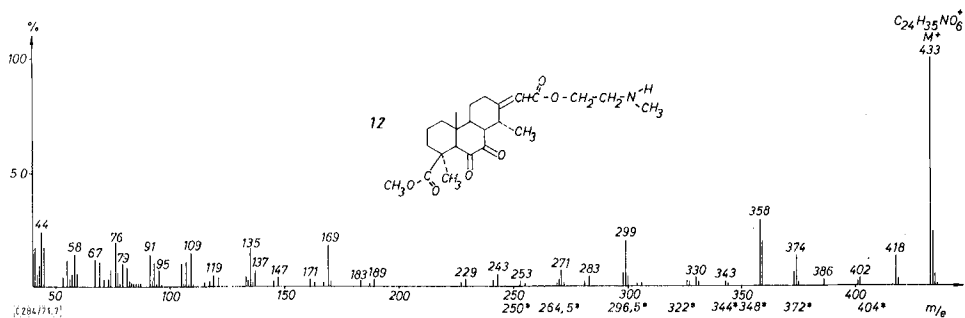


Abbild. 6. Massenspektrum der Erythrosuminsäure (11)



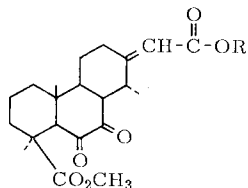
### 5. Dehydro-norerythrosuamin (12)

Eine ebenfalls nur in geringer Menge erhaltene Base hatte die Bruttoformel  $C_{24}H_{35}NO_6$ . Aus den im Massenspektrum (Abbild. 7) angezeigten Schlüsselbruchstücken bei  $M-74$  und  $M-58$  der Masse 44 und 58, sowie eines Ions der Masse  $299 = (358 - 59)$ , entsprechend dem Verlust von  $CH_3OC(=O)-$ , ließ sich das Vorhandensein einer Methylaminoäthanol- und einer Methoxycarbonylgruppe ableiten (Abbild. 7).



Abbild. 7. Massenspektrum des Dehydro-norerythrosuamins (12)

Ein Bruchstück der Masse 135,  $C_9H_{11}O$ , sprach dafür, daß im Ring C Sauerstoffsubstituenten fehlten [siehe das entsprechende Ion im Spektrum von **11**, Abbild. 6]. Aufgrund dieser Beobachtungen schien es möglich, daß in der Base vom Molekulargewicht 433 ein an der Hydroxylgruppe zur Carbonylgruppe oxydiertes Derivat des Norerythrosuamins vorliegen könne. Das aus Norerythrosuamin (**10**) durch schonende Chromsäureoxydation erhaltene Produkt zeigte das gleiche Massenspektrum wie die Verbindung mit dem Molekulargewicht 433. Bei der Base vom Molekulargewicht 433 handelt es sich also um Dehydro-norerythrosuamin (**12**).



**12**:  $R = -CH_2-CH_2-NH-CH_3$

### 6. Nachweis weiterer Spurenalkaloide

In sehr kleinen Mengen konnten im Gemisch weitere Alkaloide mit den Molekulargewichten 447, 449, 477, 491, 493 nachgewiesen werden. Da sie nicht in reiner Form zu gewinnen waren, mußte eine Strukturaufklärung unterbleiben.

## II. Untersuchung der Rinde von *Erythrophleum guineense*\*)

Aus der zerkleinerten *Erythrophleum*-Rinde erhielten wir einen Rohbasenextrakt von ähnlicher Zusammensetzung wie das Muawin. Nach säulen- und dünnschichtchromatographischer Trennung konnten die Verbindungen **4**, **7**, **10** und **12** als Haupt-

\*) Für die Beschaffung der Rinde danken wir ebenfalls Herrn Dr. G. Seitz von der Fa. E. Merck AG, Darmstadt.

bestandteile nachgewiesen werden. Cassamin und weitere Basen mit den Molekulargewichten 375, 377, 447, 449 und 463 waren im Vergleich zum Muawin angereichert, aber in doch so geringer Menge vorhanden, daß eine zur Strukturaufklärung nötige Trennung in Reinstoffe nicht möglich war.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* danken wir für die Unterstützung der Arbeit durch Sachbeihilfen.

## Beschreibung der Versuche

Die Massenspektren wurden mit einem Varian-MAT CH 4-Massenspektrometer (EB 4 Ionenquelle) durch direkte Einführung der Proben in die Ionenquelle aufgenommen. Die Elektronenenergie betrug 70 eV. Die Ionenquellentemperatur wurde zwischen 80–90° gehalten. Die Verdampfungstemperatur für Basen lag bei 120° und für Säuren bei 160–170°. Bruttoformeln wurden durch „peakmatching“ mit PFK als Referenzsubstanz auf einem SM 1 B Massenspektrometer bestimmt. Für die Messungen danken wir Herrn Dr. G. Remberg.

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian A 100-Gerät im 100 MHz-Bereich registriert, Lösungsmittel: Deuteriochloroform. Innerer Standard: TMS.

Das IR-Spektrum von **3** wurde als KBr-Preßling auf einem Perkin-Elmer-Gerät vom Typ 225 aufgenommen.

Die Drehungen wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät vom Typ 141 in einer 1-ccm-Küvette bestimmt.

Die Schmelzpunkte wurden unter einem Koller-Mikroskop gemessen und sind unkorrigiert.

*Extraktion der Rinde von Erythrophleum guineense*: 850 g Rindenpulver \*) wurden analog *Dalma*<sup>16)</sup> extrahiert und auf Alkaloide aufgearbeitet. Es wurden 2.65 g Rohbasengemisch (Basenextrakt 1 = B. 1) erhalten. Dies entspricht einem Alkaloidgehalt von 0.3%.

*Aufarbeitung von Muawin*: 3 g *Muawin-hydrobromid* wurden in 40 ccm Wasser gelöst und von Holzbestandteilen abfiltriert. Die neutrale Salzlösung wurde mit Ammoniak auf pH 9–9.5 gebracht, wiederholt mit Äther und anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Trocknen der beiden Auszüge mit frisch geglühtem Magnesiumsulfat und Verdunsten der Lösungsmittel verblieben aus dem Ätherextrakt ein Rückstand von 1.97 g (B. 2) und aus dem Chloroformextrakt von 0.78 g (B. 3). Da B. 2 und B. 3 gleiche Alkaloide enthielten (allerdings war in B. 2 Norcassamin (**4**) angereichert), wurden die Extrakte vereinigt.

### *Chromatographie der Alkaloidgemische an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*<sup>8)</sup>

1) 2.6 g des B. 1 wurden an einer Säule von 650 g Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Woelm, neutral, mit 83 ccm Wasser desaktiviert \*\*) chromatographiert. Fraktionen zu je 20 ccm wurden aufgefangen. Das fortschreitende Chromatogramm wurde kontrolliert durch stichprobenartige Aufnahme von Massenspektren zur Trockne eingedampfter Fraktionen (s. Tab. 1).

2) 2.5 g der Extrakte B. 1 und B. 2 wurden an 500 g desaktiviertem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert (s. Tab. 2).

\*) Leider können wir über den Standort der Bäume keine Angaben machen.

\*\*) Die Chromatographie muß an desaktiviertem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zügig und bei nicht zu hoher Raumtemperatur durchgeführt werden. Andernfalls verseifen die Basen zum Teil und es kommt infolge von Salzbildungen zwischen den Basen und Säuren bei der anschließenden DC-Trennung zu Komplikationen.

<sup>16)</sup> G. Dalma, Helv. chim. Acta **22**, 1497 (1939).

Tab. 1. Chromatographie von B. 1 an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Fraktionen	gef. Basen	Lösungsmittel (in %)		Gewicht [g]
		Benzol/Chlf./THF	Methanol	
1–40	keine Alkaloide	60	40	
41–78	<b>5</b>	20	80	0.06
79–97	Alkaloid (Mol.-Gew. 449)	99	1	0.02
98–128	Alkaloide (Mol.-Gew. 449 und 447)	90	10	0.1
129–165	<b>4</b> und Alkaloid (Mol.-Gew. 447)	80	20	0.1
166–205	<b>4</b>	50	50	0.6
206–233	<b>10</b>		100	0.08
234–280	<b>12</b>	99.9	0.1	0.06
281–325	<b>12</b> und <b>7</b>	99.5	0.5	0.5
326–390	<b>7</b>	95	5	0.55
				Gesamt: 2.07 g

Tab. 2. Chromatographie von B. 2 und B. 3 an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Fraktionen	gef. Basen	Lösungsmittel (in %)			Gewicht [g]
		Benzol/Chlf./Äthanol			
1–60	keine Alkaloide				
61–89	Alkaloide (Mol.-Gew. 339 und 311)	90	10	–	0.02
90–132	<b>5</b>	75	25	–	0.08
133–155	Alkaloide (Mol.-Gew. 447 und 449)	50	50	–	0.1
156–200	<b>4</b> und Alkaloid (Mol.-Gew. 391)	30	70	–	0.72
201–228	<b>4</b>	10	90	–	0.3
229–241	<b>10</b> und <b>12</b>	–	100	–	0.08
242–270	<b>12</b> und <b>7</b>	–	99.9	0.1	0.2
271–300	<b>7</b>	–	99	1	0.15
301–335	<b>7</b> und Alkaloid (Mol.-Gew. 375)	–	95	5	0.15
				Gesamt: 1.8 g	

*Dünnschichtchromatographie an Kieselgel:* Die erhaltenen Fraktionen wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel Merck HR, Laufmittel: Cyclohexan, Methylenchlorid, Diäthylamin in wechselndem Verhältnis, s. Tab. 3) gereinigt. Zur Kennzeichnung der Zonen wurden die Platten nach dem Entwickeln unter der UV-Lampe betrachtet (keine Fluoreszenz alkaloidhaltiger Zonen bei 350 m $\mu$ ) und mit Jodplattat<sup>17)</sup> (zuerst blau-violette Flecken auf rotem, dann ockerfarbene Flecken auf weißem Grund) oder mit Dragendorffs Reagenz<sup>3)</sup> (dunkel-braunrote Flecken auf hellrotem Grund) besprüht.

Tab. 3. Laufmittelsysteme (Volumenverhältnis der Lösungsmittel)

	Cyclohexan	Methylenchlorid	Diäthylamin
I	1	9	0.5
II	6	3	0.5
III	10	3	0.5

<sup>17)</sup> K. Randerath, Dünnschichtchromatographie, S. 73, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1962.

*Reindarstellung der Alkaloide*

*Cassain* (1): 50 mg der Merckschen Droge *Cassain* wurden mit dem Laufmittel-System III an Kieselgel chromatographiert und somit von einer um 2 Masseneinheiten leichteren Beimengung abgetrennt. Die erste Zone (von der Lösungsmittelfront gerechnet) enthielt das gesuchte 1. Nach Umkristallisieren aus Äther/Äthanol verblieben etwa 10 mg reines Alkaloid (Massenspektrum s. Abbild. 1). Schmp. 142° (nach Lit.<sup>18)</sup>: 142°).

*Cassainsäure* (2) durch Verseifung von 1: 5 mg des gereinigten *Cassains* wurden mit 4 ccm 2*n* HCl 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen flockte die Säure 2 aus. Sie wurde abfiltriert und einmal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert (Massenspektrum s. Abbild. 2). Schmp. 212–213° (nach Lit.<sup>18)</sup>: 213°).

*Norcassamin* (4)

a) Die Chromatogrammfraktionen 166–205 (Tab. 1) wurden dünn-schichtchromatographisch (Laufmittelsystem II) gereinigt. Die unterste Zone enthielt 4.

b) Eine weitere Charge wurde durch Molekularsiebfiltration der Fraktionen 201–228 (Tab. 2) an einer Sephadex-Säule gewonnen (100 g Sephadex LH-20; 0.2 g Substrat; Äthanol zur Entwicklung).

Nach mehrtägigem Stehenlassen der methanolischen Lösung der Base schieden sich Kristalle ab. Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Äthanol/Äther (1:100) erhielten wir 200 mg reines Alkaloid (Massenspektrum s. Abbild. 3). Schmp. 139–140°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-26.8^\circ$  ( $c = 0.9$ , Äthanol). Hydrochlorid<sup>11)</sup>: Schmp. 198–200° (Zers.).

NMR:  $\delta$  0.82 (10-CH<sub>3</sub>); 1.18 (4-CH<sub>3</sub>); 1.11 d,  $J = 7$  Hz (14-CH<sub>3</sub>); 3.07 (N-CH<sub>3</sub>); 3.65 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.87 (18-H).

C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub> (419.6) Ber. C 68.71 H 8.89 N 3.34 Gef. C 68.57 H 8.75 N 3.33

*Cassaminsäure* (3) durch Verseifung von 4: 20 mg 4 wurden in 6 ccm 2*n* HCl gelöst und unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die nach etwa 1 Stde. ausflockende Säure 3, 7 mg, wurde abfiltriert und das Filtrat 3 Stdn. erhitzt, wobei weitere 3 mg der Säure erhalten wurden. Nach Ausweis des Massenspektrums waren die beiden Chargen identisch ( $M^+ = 362$ ). Sie wurden vereinigt und zweimal mit Aceton/Wasser umkristallisiert. Wir erhielten 8 mg 3. Schmp. 217–218°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-59.5^\circ$  ( $c = 0.95$ , Äthanol) (nach Lit.<sup>18)</sup>: Schmp. 218°,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-62^\circ$  (Äthanol).

Die Banden des IR-Spektrums<sup>11)</sup> und die Signale des NMR-Spektrums<sup>8)</sup> stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

*Norcassamidin* (7) durch Reduktion von 4: 20 mg der Base 4 wurden mit einer Lösung von 4 mg NaBH<sub>4</sub> in 3 ccm Methanol versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zusatz einiger Tropfen 2*n* HCl bis zur sauren Reaktion wurde das Methanol am Rotationsverdampfer abdestilliert, mit etwas Wasser verdünnt und einmal mit Äther gewaschen. Nach Zufügen von verd. NaOH wurde die Base ausgeäthert. Durch Umkristallisieren mit Äthanol/Äther erhielten wir 10 mg reines 7, identisch (MS, NMR, Schmp.) mit dem aus Muawin und der Rinde isolierten Alkaloid *Norcassamidin* (7), s. u.

*Cassamidinsäure* (6) durch Reduktion von 3: 5 mg 3 wurden zusammen mit 1.5 mg NaBH<sub>4</sub> in 2 ccm Methanol gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht stehengelassen. Nach Verdünnen mit 5 ccm Wasser und Ansäuern mit verd. Essigsäure kristallisierten 4 mg Säure 6 aus. Durch Umkristallisieren mit Aceton/Wasser erhielten wir farblose Plättchen vom Schmp.

<sup>18)</sup> H.-G. Boit, Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 1960, S. 5, Akademie-Verlag, Berlin 1961.

233° (Subl.) (nach Lit.<sup>11)</sup>: 235°). Der Misch-Schmelzpunkt mit der aus 7 durch saure Hydrolyse erhaltenen Säure ergab keine Depression;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-53^\circ$  ( $c = 0.4$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (nach Lit.<sup>11)</sup>:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-56^\circ$  ( $c = 0.95$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ )).

*Norcassamidin* (7): Nach wiederholter Chromatographie der Fraktionen 326–390 (B. 1) und 217–300 (B. 2 und B. 3) an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und anschließend an Kieselgel HR (Laufmittelsystem I) konnten etwa 50 mg reines 7 isoliert werden (Massenspektrum s. Abbild. 4), Schmp. 115° (Äthanol/Äther);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-22.5^\circ$  ( $c = 0.65$ , Äthanol). NMR:  $\delta$  0.64 (10- $\text{CH}_3$ ); 1.20 (4- $\text{CH}_3$ ); 1.09 d,  $J = 7$  Hz (14- $\text{CH}_3$ ); 3.06 (N- $\text{CH}_3$ ); 3.63 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 5.83 (18-H).

Hydrochlorid<sup>11)</sup>: amorph.

$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_5$  (421.6) Ber. C 68.38 H 9.32 N 3.32 Gef. C 68.38 H 9.20 N 3.30

*Cassamin* (5): Ein Teil (70 mg) der Frakt. 90–132 (Tab. 2) wurde in der üblichen Weise 6 Stdn. sauer verseift. Als Hydrolyseprodukt erhielten wir 8 mg einer Säure, die nach Umkristallisieren identisch war (MS, Schmp.) mit dem Abbauprodukt von 4. Es mußte daher Cassaminsäure (3) aus 5 sein. Die schlechte Ausbeute an 3 ist auf erhebliche Beimengungen an unverseifbaren Verbindungen der Mol.-Gew. 311 und 339 im Ausgangsmaterial zurückzuführen.

*Norerythrosuamin* (10): Durch Rechromatographieren der Frakt. 229–241 (Tab. 2) an Aluminiumoxid (nur mit 6% Wasser desaktiviert) gelang es, die Verbindung 10 von Beimengungen des Alkaloids 12 zu befreien. Zuerst wurde 10 und dann 12 von der Säule eluiert.

Lösungen der Base mußten schonend eingedampft werden, weil sie sich unter Zersetzung bei Temperaturen über 70° braun färbten. Wir erhielten 15 mg amorphe Base 10,  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-71.9^\circ$  ( $c = 0.44$ , Äthanol) (Massenspektrum s. Abbild. 5). Die Signale im NMR-Spektrum sind in guter Übereinstimmung mit den für Erythrosuamin gemessenen<sup>9)</sup>. NMR:  $\delta$  0.90 (10- $\text{CH}_3$ ); 1.21 (4- $\text{CH}_3$ ); 1.20 d,  $J = 7$  Hz (14- $\text{CH}_3$ ); 3.06 (N- $\text{CH}_3$ ); 3.67 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ); 5.88 (18-H). Analyse<sup>19)</sup>.

*Erythrosuaminsäure* (11) durch Verseifung von 10: 10 mg 10 wurden wie oben beschrieben 5 Stdn. verseift. Das Verseifungsprodukt (4 mg) wurde nach Umkristallisieren (Äthanol/Wasser) als 11 identifiziert (Massenspektrum s. Abbild. 6), Schmp. 193° (nach Lit.<sup>8)</sup>: 195 bis 196°),  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-73^\circ$  ( $c = 0.4$ , Äthanol) (nach Lit.<sup>8)</sup>:  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-75^\circ$  ( $c = 1.0$ , Äthanol)).

*Dehydro-norerythrosuamin* (12) durch Oxydation von 10: Zu einer Lösung von 8.8 mg Chrom(VI)-oxid in 3 ccm Pyridin (dest., über KOH getrocknet) wurden 8.6 mg (0.02 mMol) der Base 10 in 3 ccm Pyridin gegeben und 8 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 10 ccm Eiswasser gegeben und 3 mal mit Methylenchlorid und 4 mal mit Äther ausgeschüttelt. Nach vorsichtigem Abdestillieren der Lösungsmittel und Spuren von Pyridin gelangte das Produkt zur massenspektrometrischen Aufnahme. Es erwies sich als identisch mit dem isolierten Alkaloid 12, s. u. Für eine Messung der opt. Aktivität reichte die Menge nicht aus.

*Dehydro-norerythrosuamin* (12): Nach Chromatographie der Frakt. 242–270 (Tab. 2) an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  isolierten wir 15 mg amorphe Base 12;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-41^\circ$  ( $c = 0.3$ , Äthanol), Massenspektrum s. Abbild. 7.

Bei der sauren Verseifung (3 Stdn., 2N HCl) von 12 mg des Alkaloids 12 erhielten wir nur 4 mg amorphe Säure ( $M^+ = 376$ ). Bei längerer Reaktionsdauer wurde die Lösung braun und verharzte.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-62^\circ$  ( $c = 0.35$ , Äthanol). Analyse<sup>19)</sup>.

*Spurenalkaloide*: Im Verlauf der chromatographischen Trennungen reicherten wir in Gemischfraktionen die in der Tab. 4 aufgeführten Spurenalkaloide an.

<sup>19)</sup> Die verbliebene Menge von 10 und 12 reichte für eine Elementaranalyse nicht aus.

Tab. 4. Spurenalkaloide

Summenformel (Mol.-Gew.)	zur Struktur	angereichert aus
$C_{18}H_{21}NO_3$ (299)	unbekanntes Kohlenstoffgerüst	Muawin
$C_{19}H_{21}NO_3$ (311)	unbekanntes Kohlenstoffgerüst	Muawin
$C_{20}H_{21}NO_4$ (339)	unbekanntes Kohlenstoffgerüst	Muawin
$C_{25}H_{37}NO_6$ (447)	<i>Erythrophleum</i> -Alkaloid	Muawin und Rinde von <i>E. guineense</i>
$C_{25}H_{39}NO_6$ (449)	<i>Erythrophleum</i> -Alkaloid	Muawin und Rinde von <i>E. guineense</i>
$C_{30}H_{39}NO_4$ (477)	<i>Erythrophleum</i> -Alkaloid	Muawin und Rinde von <i>E. guineense</i>
$C_{33}H_{35}NO_3$ (491)	<i>Erythrophleum</i> -Alkaloid	Muawin und Rinde von <i>E. guineense</i>
$C_{33}H_{37}NO_3$ (493)	<i>Erythrophleum</i> -Alkaloid	Muawin

[284/71]