

Rudolf Tschesche, Ernst Ulrich Kaufmann und Hans-Wolfram Fehlhaber *)

Alkaloide aus Rhamnaceen, XIII¹⁾

Amphibin-B, -C, -D und -E, vier Peptidalkaloide aus *Ziziphus amphibia* A. Cheval. ²⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 18. April 1972)

Aus dem Rinden-Extrakt von *Ziziphus amphibia* A. Cheval. wurden neben dem bereits beschriebenen Amphibin-A³⁾ (1) vier weitere Peptidalkaloide, Amphibin-B, -C, -D und -E, isoliert und in der Struktur geklärt (2–5). Diese Alkaloide zählen zu den Cyclopeptidalkaloiden mit 14gliedrigem Ringsystem; sie enthalten jedoch die in pflanzlichen Peptiden unseres Wissens noch nicht aufgefundene Aminosäure *trans*-3-Hydroxy-prolin und unterscheiden sich von den meisten bisher bekannten Peptidalkaloiden zudem noch durch die um eine Aminosäure verlängerte Seitenkette.

Alkaloids from Rhamnaceae, XIII¹⁾

Amphibine-B, -C, -D, and -E, four Peptide Alkaloids from *Ziziphus amphibia* A. Cheval. ²⁾

Besides the already described Amphibine-A (1)³⁾, from the bark of *Ziziphus amphibia* A. Cheval. four new peptide alkaloids, Amphibine-B, -C, -D, and -E, have been isolated, and their structures were elucidated (2–5). These alkaloids belong to the cyclopeptide alkaloids with a fourteen-membered ring system. They contain *trans*-3-hydroxyproline, an amino acid not yet found in plant peptides, so far known; in addition, they differ from most of the known peptide alkaloids by an additional amino acid in the side chain.

Als Ausgangsmaterial zur Isolierung der Alkaloide diente getrocknete Rinde von *Ziziphus amphibia*, die in Bamako (Mali) kurz vor Beginn der Regenperiode geerntet worden war. Die Rinde wurde fein gemahlen und nach der üblichen Methode aufgearbeitet (vgl. z.B. I.c.⁴⁾). Man erhielt ein fast farbloses Rohbasen-Gemisch, das auch von anderen störenden Begleitsubstanzen weitgehend frei war. Die Auftrennung des Rohbasen-Gemischs und die Isolierung der fünf von mindestens 15 darin enthaltenen Dragendorff-aktiven Substanzen erfolgte durch stufenweise Platten- bzw. Säulenchromatographie an Kieselgel.

*) Neue Anschrift: Farbwerke Hoechst AG, D-6230 Frankfurt 80.

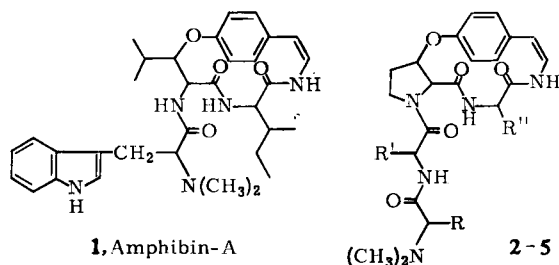
1) XII. Mitteil.: H.-W. Fehlhaber, J. Uhlendorf, S. T. David und R. Tschesche, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

2) Auszug aus der Dissertation E. U. Kaufmann, Univ. Bonn 1971.

3) R. Tschesche, E. U. Kaufmann und H.-W. Fehlhaber, Tetrahedron Letters [London] 1972, 865. Das gleiche Alkaloid wurde gleichzeitig aus *Discaria longispina* isoliert und als *Discarin A* beschrieben: A. O. Mascaretti, V. M. Merkuza, G. E. Ferraro, E. A. Ruveda, Ching-Jer Chang und E. Wenkert, Phytochemistry 11, 1133 (1972).

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

Die vier Alkaloide Amphibin-B, -C, -D und -E zeigen ihre Strukturverwandtschaft durch weitgehend ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften. Sie konnten nicht kristallin erhalten werden.



	R	R'	R''
2, Amphibin-B	C ₆ H ₅ -CH ₂ -	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	C ₆ H ₅ -CH ₂ -
3, Amphibin-C	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	C ₆ H ₅ -CH ₂ -
4, Amphibin-D	C ₆ H ₅ -CH ₂ -	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅
5, Amphibin-E	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Indolyl-CH ₂ -	-CH(CH ₃)C ₂ H ₅

Die Summenformeln wurden durch hochauflösende Massenspektrometrie zu C₃₉H₄₇N₅O₅ (2), C₃₆H₄₉N₅O₅ (3), C₃₆H₄₉N₅O₅ (4) und C₃₈H₅₀N₆O₅ (5) ermittelt. Die Probe auf aliphatische Doppelbindungen mit alkalischer Permanganatlösung verlief positiv. Mit Dragendorffs Reagenz entstand eine rotbraune Färbung. Allein Amphibin-E reagierte mit Ehrlichs Reagenz.

Absorptionsspektren

Die in Chloroform aufgenommenen IR-Spektren der Alkaloide sind weitgehend analog und stimmen in den wesentlichen Merkmalen mit den Spektren bisher untersuchter Peptidalkaloide überein (vgl. z. B. l. c. 1,4-8¹). Man erkennt typische Banden für Amide, die *N*-Methylgruppierung, eine konjugierte C=C-Doppelbindung und Banden, die auf Phenoläther hinweisen. Die UV-Spektren von Amphibin-B, -C und -D weisen neben einer starken Aromaten-Endabsorption schwach erkennbare Schultern um 250 und 280 nm auf, die dem Enamid- oder Styrylchromophor (vgl. Diskussion in l. c. 6²) bzw. einer Phenoläther-Absorption zugeschrieben werden können. Das UV-Spektrum von Amphibin-E zeigt deutlich erkennbare Maxima bei 290, 281, 270 und 220 nm, die für Tryptophan als Molekülbaustein sprechen. In den CD-Spektren treten schwach positive Maxima um 285 nm und stark negative Maxima um 237 nm auf; sie entsprechen qualitativ denen bekannter 14gliedriger Cyclopeptidalkaloide.

Gemeinsames Merkmal der NMR-Spektren aller Alkaloide ist das scharfe Signal der *N,N*-Dimethyl-Gruppierung bei τ 7.6. Zwischen τ 9.0 und 9.4 liegt der Signalkomplex der *C*-Methylgruppen mit 12 Protonen beim Amphibin-C, -D und -E und

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

⁶) R. Tschesche, J. Rheingans, H.-W. Fehlhaber und G. Legler, Chem. Ber. **100**, 3924 (1967).

⁷) R. Tschesche, E. Froberg und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **103**, 2501 (1970).

⁸) R. Tschesche, L. Behrendt und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **102**, 50 (1969).

6 Protonen beim Amphibin-B. Bei τ 5.0 bis 7.5 überlagern sich die Signale der Benzylprotonen des Phenylalanins (Amphibin-B, -C, -D) bzw. Methylenprotonen in Nachbarschaft zur Indolgruppe des Tryptophans (Amphibin-E) mit denen der α -H-Atome der Aminosäuren und den C-4- und C-5-Protonen des 3-Hydroxy-prolins. Das Signal des C-2-Protons des 3-Hydroxy-prolins erscheint um τ 5.8 als Dublett (J um 5.5 Hz); man beobachtet Kopplung mit dem C-3-Proton bei τ 4.9, wie durch Doppelresonanz-Experimente bewiesen werden konnte. Das C-2-Proton des 4-Hydroxy-prolins liefert, wie ein Vergleichsspektrum ergab, an dieser Stelle ein Doppel-Dublett mit den Kopplungskonstanten $J_{2,3a} = 7$ Hz und $J_{2,3b} = 10$ Hz. Signale zwischen τ 3.2 und 3.8 sind den Olefinprotonen zuzuordnen; sie erscheinen als Dubletts mit Kopplungskonstanten zwischen 5 und 7 Hz, wenn das Alkaloid zum Austausch der Amidprotonen mehrfach mit $D_2O/MeOD$ behandelt wurde. Im Bereich von τ 2.5–3.0 liegen die Signale der Aromaten- und Amidprotonen.

Hydrolysen

Amphibin-B, -C, -D und -E wurden über Palladium auf Aktivkohle in Methanol katalytisch hydriert. Die Reaktionsprodukte konnten chromatographisch gereinigt und massenspektrometrisch als Dihydro-Alkaloide identifiziert werden. Bei der Hydrierung über vorreduziertem Platinoxid wurden, wie (M+6)-Peaks – beim Amphibin-B sogar ein (M+12)-Peak – in den Massenspektren der Hydrierungsprodukte zeigten, offenbar in geringem Umfang auch Aromaten angegriffen. Nach einer Totalhydrolyse der Dihydro-Alkaloide mit $6n$ HCl im Bombenrohr bei 120° ließen sich in den Hydrolysaten durch chromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen Isoleucin (bei 2–5), Phenylalanin (bei 2 und 3), *N,N*-Dimethyl-leucin (bei 3 und 5) und *N,N*-Dimethyl-phenylalanin (bei 2 und 4) nachweisen. Neben den Aminosäuren fand sich in allen Hydrolysaten noch *p*-Tyramin; es entstammt der im Alkaloid ursprünglich vorhanden gewesenen *p*-Hydroxy-styrylamin-Einheit. *p*-Tyramin wurde auf dem Papierchromatogramm mit Diazosulfanilsäure gekuppelt und damit von dem *ortho*- und *meta*-Isomeren durch unterschiedliche R_f -Werte⁷⁾ und Farbreaktionen⁸⁾ unterschieden.

Das im Amphibin-E als Strukturelement enthaltene Tryptophan war nach der sauren Hydrolyse erwartungsgemäß nicht nachweisbar, wohl aber nach einer Alkali-hydrolyse des Alkaloids. Hydroxyprolin konnte in den Säure-Hydrolysaten nicht identifiziert werden, da Hydroxyprolin-aryläther unter den Hydrolysebedingungen zu Pyrrolincarbonsäure gespalten werden, woraus durch Isomerisierung und Decarboxylierung u. a. Δ^1 -Pyrrolin entsteht⁹⁾. Durch mehrstündige Ozonolyse der Alkaloide wurden daher die aromatischen Ringe zerstört, so daß der Hydroxyprolinäther in einen Ester (der Oxalsäure) umgewandelt wurde; nach der anschließenden Hydrolyse war dann die Isolierung unveränderten Hydroxyprolins möglich⁹⁾.

Das weit verbreitete 4-Hydroxy-prolin ist zwar in Peptidalkaloiden bereits aufgefunden worden^{9,10)}, ergäbe aber im vorliegenden Fall einen 15gliedrigen Ring, der wegen der Übereinstimmung der UV- und CD-Spektren mit denen 14gliedriger Peptidalkaloide unwahrscheinlich ist. Die seltenere Aminosäure 3-Hydroxy-prolin wurde aus Collagen¹¹⁾, dem

⁹⁾ E. Zbiral, E. L. Menard und J. M. Müller, Helv. chim. Acta **48**, 404 (1965).

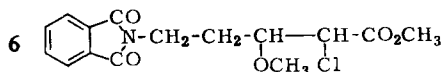
¹⁰⁾ M. Pailer, E. Haslinger und E. Zbiral, Mh. Chem. **100**, 1608 (1969).

¹¹⁾ J. D. Ogle, R. B. Arlinghaus und M. A. Logan, J. biol. Chemistry **237**, 3667 (1962).

Antibiotikum Telomycin¹²⁾ und aus Mittelmeerschwämmen¹³⁾ isoliert. *Fowden* und Mitarbeiter¹⁴⁾ fanden *trans*-3-Hydroxy-prolin erstmals in einer Pflanze (*Delorix regia*), allerdings in ungebundener Form.

In den nach Ozonolyse gewonnenen Hydrolysaten wurde nach Anreicherung der Aminosäuren durch Ionenaustauscher-Chromatographie als vierte Aminosäure 3-Hydroxy-prolin nachgewiesen. Durch Vergleich mit authentischem *cis*- und *trans*-3-Hydroxy-prolin ließ sich unter Verwendung verschiedener Chromatographie-Systeme eindeutig sicherstellen, daß es in der *trans*-Konfiguration vorliegt. Dieser Befund schien zunächst im Widerspruch zu den NMR-Spektren der Alkaloide zu stehen, die mit einer Kopplungskonstante von ca. 5.5 Hz für das Signal des C-2-Protons am 3-Hydroxy-prolin eher mit einer *cis*-Konfiguration im Einklang wären¹⁵⁾. Da *Logan* und Mitarbeiter¹⁵⁾ feststellten, daß unter bestimmten Reaktionsbedingungen eine Epimerisierung am C-2 des 3-Hydroxy-prolins stattfinden kann, wurde eine Probe *cis*-3-Methoxy-prolin den bei den Alkaloiden angewandten Ozonolyse- und Hydrolysebedingungen unterworfen. Die chromatographische Untersuchung des Reaktionsproduktes ergab jedoch keinen Hinweis auf Epimerisierung. Zur Deutung der NMR-Spektren muß daher angenommen werden, daß durch den Einbau der Aminosäure in ein gespanntes Ringsystem die Konformation des Pyrrolidinringes und damit der Diederwinkel zwischen den C-2- und C-3-Protonen verändert ist.

Die Synthese von *cis*- und *trans*-3-Hydroxy-prolin^{11-13,16)} konnte einfacher und ergiebiger gestaltet werden durch Umsetzung des leicht zugänglichen 5-Phthalimido- Δ^2 -pentencarbonsäure-(1)-methylesters¹⁷⁾ mit tert.-Butylhypochlorit in Methanol zu dem von *Logan* und Mitarbeiter¹¹⁾ als Zwischenprodukt benutzten 2-Chlor-3-methoxy-5-phthalimido-valeriansäure-methylester (**6**). Dieser kann analog dem für die entsprechende Brom-Verbindung beschriebenen Verfahren¹²⁾, aber in besserer Ausbeute, zu *cis*- und *trans*-3-Hydroxy-prolin weiterverarbeitet werden.



Massenspektren

Das für cyclische Peptidalkaloide mit 14gliedrigem Ringsystem gültige Fragmentierungsschema¹⁸⁾ läßt sich auf Amphibin-B, -C, -D und -E nur teilweise anwenden. Dies beruht im wesentlichen auf dem Einbau der cyclischen Aminosäure 3-Hydroxy-prolin, wodurch die sonst übliche Aufspaltung des Ringsystems infolge Homolyse der dem Äthersauerstoff benachbarten C—C-Bindung¹⁸⁾ nicht mehr möglich ist. Die um eine Aminosäure verlängerte Seitenkette trägt weiterhin dazu bei, daß manche

12) *J. C. Sheehan* und *J. G. Whitney*, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3980 (1962), und **85**, 3863 (1963).

13) *F. Irreverre*, *K. Morita*, *A. V. Robertson* und *B. Witkop*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2824 (1963).

14) *May-Lin Sung* und *L. Fowden*, *Phytochemistry* **7**, 2061 (1968).

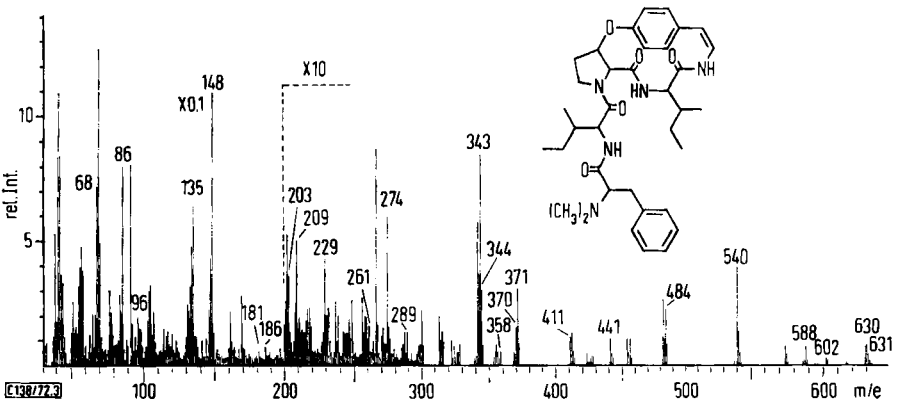
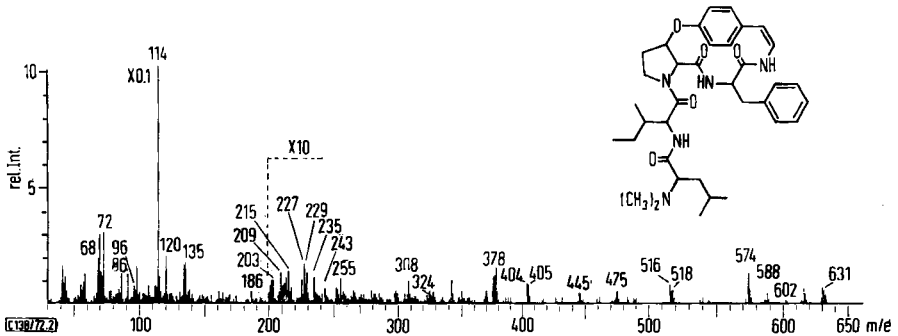
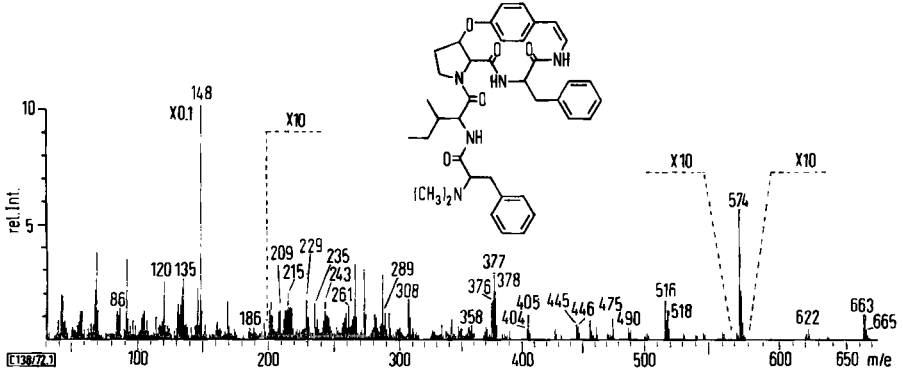
15) *J. S. Wolff*, *J. D. Ogle* und *M. A. Logan*, *J. biol. Chemistry* **241**, 1300 (1966).

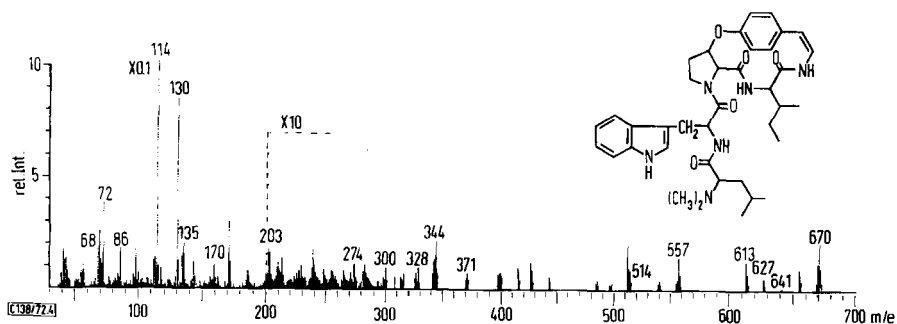
16) *K. Morita*, *F. Irreverre*, *F. Sakiyama* und *B. Witkop*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2832 (1963).

17) *B. R. Baker*, *R. E. Schaub*, *M. V. Querry* und *J. H. Williams*, *J. org. Chemistry* **17**, 77 (1952).

18) *H.-W. Fehlhauer*, *Z. analyt. Chem.* **235**, 91 (1968).

sonst typischen Fragmente kaum oder überhaupt nicht wahrnehmbar sind. Dennoch erhält man durch systematische Auswertung der Spektren aller vier Alkaloide (Abbild. 1–4) – gestützt auf umfangreiche Messungen mittels Hochoauflösung – alle notwendigen Informationen über die Anordnung der Einzelbausteine im Molekül und somit über die Struktur.















Abbild. 4. Massenspektrum von Amphibin-E

Tab. I. Charakteristische Bruchstück-Ionen in den Massenspektren der Amphibine. (In den Formeln steht X für das vollständige 14gliedrige Ringsystem einschließlich 3-Hydroxy-prolin)

Ion	Struktur	m/e			
		2	3	4	5
M ⁺		665	631	631	670
a	$(\text{CH}_3)_2\overset{+}{\text{N}}=\underset{\text{R}}{\text{C}}\text{H}$	148	114	148	114
b	$(\text{CH}_3)_2\overset{+}{\text{N}}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{X}$	574	574	540	613
c	$\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	518	518	484	557
d	$\text{OCN}-\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{X}]^{\dagger}$	516	516	482	555
e	$\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}=\underset{\text{OH}}{\text{C}}-\text{X}]^{\dagger}$	475	475	441	514
e'	} Sekundärreaktionen bei R' = C ₄ H ₉	446	446	-)	-)
e''		445	445	411	-)
f	$\text{OHC}-\text{X}]^{\dagger}$	405	405	371	371
g	$\overset{+}{\text{O}}=\text{C}-\text{X}$	404	404	370	-)
h	H_2X^+	378	378	344	344
i	$\text{H}-\text{X}]^{\dagger}$	377	377	343	343
j	X^+	376	376	342	342
k	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{R}}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{N}^+$	358	324	358	-)
l	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{R}}{\text{C}}\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{C}}\text{H}-\text{C}=\text{O}^+$	289	255	289	328

Tab. 1. Fortsetzung

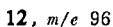
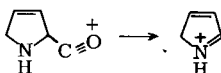
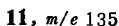
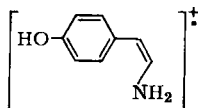
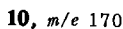
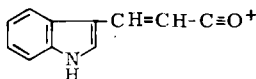
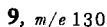
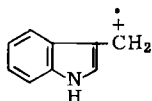
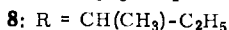
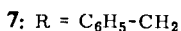
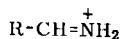
Ion	Struktur	m/e			
		2	3	4	5
m	$(\text{CH}_3)_2\text{N}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-\overset{+}{\text{NH}}-\underset{\text{R}'}{\text{CH}}$	261	227	261	300
n	$\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}'}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{N}^+$ 	209	209	(209)	- ⁺)
o	$\text{OCN}-\underset{\text{R}'}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{N}^+$ 	235	235	235	- ⁺)
p	 -CO-NH- $\underset{\text{R}''}{\text{CH}}-\text{C}=\text{O}^+$	243	243	(209)	209
q	$\text{CO}-\overset{+}{\text{NH}}-\underset{\text{R}''}{\text{CH}}$ 	215	215	181	181
r	 -O-  -CH=CH OCN	229	229	229	- ⁺)
s	 -O-  -CH=CH NH ₂	203	203	203	203
t	 -O-  -C≡CH	186	186	186	- ⁺)
u	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\underset{\text{R}''}{\text{CH}}^+$ OCN-CH-CO-NH	308	308	274	274

⁺) Peaks entsprechender Massenzahl erscheinen zwar im Massenspektrum; die durch Hochauflösung ermittelten Summenformeln stimmen jedoch nicht mit der formulierten Struktur überein.

Den Basispeak des Massenspektrums bildet erwartungsgemäß das Aminfragment der terminalen *N,N*-Dimethylaminosäure (**a**, vgl. Tab. 1); als Gegenstück dazu entsteht durch radikalische Abspaltung des Restes R das Bruchstück-Ion **b**. Bei Amphibin-C und -E eliminiert **a** in einer Sekundärreaktion Propen, woran *N,N*-Dimethyl-leucin erkannt werden kann⁶⁾. Für Phenylalanin und Isoleucin beobachtet man die Aminfragmente *m/e* 120 (**7**) und *m/e* 86 (**8**). Das Tryptophan im Amphibin-E liefert die Bruchstücke *m/e* 130 (**9**) und *m/e* 170 (**10**)¹⁹⁾. Das Fragment *m/e* 135 (**11**) entstammt der für die meisten Peptidalkaloide typischen *p*-Hydroxystyrylamin-Gruppierung^{6,18)}. Offenbar auf Hydroxyprolin zurückzuführen sind die Ionen *m/e* 96 (**12**) und *m/e* 68 (**13**).

Durch den stufenweisen Abbau der Peptidseitenkette sowie den Zerfall des Ring-systems entsteht eine Vielzahl von Fragment-Ionen (s. Tab. 1), von denen für die Strukturzuordnung vor allem jene von Bedeutung sind, die aus zwei Untereinheiten

¹⁹⁾ P. Pfänder, Liebigs Ann. Chem. **707**, 209 (1967); F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. K. Sun, Z. Naturforsch. **20b**, 1169 (1965).



bestehen und damit deren Verknüpfung beweisen. So läßt sich aus den Ionen **l**–**o** die Aminosäuresequenz der Seitenkette bis hin zum 3-Hydroxy-prolin erkennen, und aus den einander überlappenden Bruchstücken **p**–**u** folgt die Struktur des 14gliedrigen Ringsystems.

Im Massenspektrum von Amphibin-E (**5**) erscheinen zwei Peaks geringer Intensität bei m/e 443 und m/e 415, die den Ionen **h** und **i** mit Tryptophan im Ringsystem entsprechen könnten und so auf die Anwesenheit eines zu **5** isomeren Alkaloids hindeuten. Chromatographisch ist Amphibin-E jedoch vollkommen einheitlich, und das Massenspektrum liefert zu den beiden erwähnten Ionen keinerlei ergänzende Hinweise. — Die Massenspektren der Dihydroderivate sind völlig analog; soweit die Bruchstücke die *p*-Hydroxystyrylamin-Gruppierung enthalten, erscheinen sie um +2 Masseneinheiten verschoben.

Wir danken Herrn Prof. Dr. J. C. Sheehan, Massachusetts Institute of Technology, für Proben von *cis*- und *trans*-3-Hydroxy-prolin, Herrn P. Garnier, Montpellier, für die Beschaffung der Droge sowie Herrn Dr. H. Last für deren Vorprüfung und wichtige Hinweise zu Beginn der Arbeit. Unser Dank gilt ferner der *Stiftung Volkswagenwerk* für die zur Anschaffung des Massenspektrometers bereitgestellten Mittel sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Gewährung von Sachmitteln.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin Elmer 221 (IR), Varian A 60 und Bruker-Physik HX 90 (NMR), Cary 14 (UV) und Dichrographie-II Roussel-Jouan (CD). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer MS 9 (A.E.I.) durch Verdampfen der Substanzen in der Ionenquelle (bei ca. 200°) bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen.

Zur Dünnschichtchromatographie dienten Kieselgel PF₂₅₄, PF₂₅₄₊₃₆₆ oder HF₂₅₄ (Merck) sowie Aluminiumoxid neutral (Woelm), zur Säulenchromatographie Kieselgel M (Gebr. Herrmann/Köln) und Kieselgel Woelm 0.05–0.2 mm. Dabei kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung. System A: Methylenchlorid/Methanol (49:1); System B: Chloroform/Methanol (49:1); System C: Essigester/Benzol/Äthanol (10:5:1); System D: Cyclohexan/Aceton (4:1); System E: Cyclohexan/Aceton (3:2).

Isolierung und Auftrennung der Rohalkaloide: 10 kg getrocknete Rinde wurden fein gemahlen und in 2-kg-Portionen je viermal mit 5 l Methanol extrahiert. Jeweils 1 kg des bis zur sirupösen Konsistenz eingedampften Methanol-Extraktes wurden mit der gleichen Menge Wasser aufgenommen, mit konz. Ammoniak auf pH 9 eingestellt und viermal mit je 500 ccm Benzol ausgezogen; dabei waren intensive mechanische Durchmischung und anschließendes Zentrifugieren notwendig. Die vereinigten benzolischen Lösungen wurden auf 500 ccm eingeeengt und dann fünfmal mit je 200 ccm 5proz. wäßr. Citronensäure-Lösung extrahiert. Der Extrakt wurde wiederum ammoniakalisch gemacht und viermal mit 500 ccm Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Methylenchlorids i. Vak. erhielt man 19.5 g eines hellgelben, schaumigen Rohalkaloidgemisches, entspr. 0.19% (bez. auf die trockene Droge). 18 g Rohbasengemisch chromatographierte man zur Vortrennung auf 800 g Kieselgel M im System A; es wurden 30-ccm-Fractionen entnommen, die Laufgeschwindigkeit betrug 150–200 ccm/Stde. Folgende Fractionen wurden aufgefangen.

Fraktion-Nr.	Hauptsubstanz	Nebensubstanzen	Menge (g)
1–200	Vorlauf; ZA-1, ZA-2*)		4.1
201–209	1, 2	ZA-3, 3, 4	3.4
210–213	3	1, 2, 4	3.0
214–218	3, 4	ZA-8	3.4
219–240	ZA-8, 5, ZA-10		0.9
241–288	5	ZA-10, ZA-11, ZA-12	1.7
289–456	ZA-12, ZA-13		0.5
Methanol-Eluat	ZA-14, ZA-15		0.7

Die weitere chromatographische Trennung der Alkaloide erfolgte an Kieselgel auf Dickschichtplatten (SchC) oder Säulen (SC).

Amphibin-A (1): Auftrennung eines aus den Fractionen 201–213 mit Methylenchlorid erhaltenen Kristallisats mittels SchC im System C und anschließende mehrfache SchC im System B ergab 600 mg *Amphibin-A (1)*, das aus Methylenchlorid, Chloroform oder Acetonitril in dünnen, farblosen Nadeln kristallisiert; die analytischen Daten finden sich unter l. c.³⁾

*) Die Chiffren „ZA“ bezeichnen weitere mit Dragendorffs Reagenz anfärbbare Substanzen; ihre Untersuchung ist noch nicht abgeschlossen.

Amphibin-B (2): Die nach der Kristallisation von **1** aus den Fraktionen 201–209 erhaltenen Mutterlaugen wurden einer erneuten SC im System A unterworfen. Aus den unpolaren Fraktionen erhielt man durch stufenweise mehrfache SchC in den Systemen C, E und B insgesamt 1.85 g *Amphibin-B (2)* als farbloses, amorphes Pulver. $[\alpha]_D^{20}$: -181° ($c = 0.08$, Methanol).

$C_{39}H_{47}N_5O_5$ Ber. N 10.52

Gef. N 10.25 Mol.-Gew. Ber. 665.3577 Gef. 665.3548 (MS)

IR (CHCl₃): 3390 (NH), 2780 (NCH₃), 1685 (Amide) und 1235/cm (Phenoläther).

NMR (CDCl₃): τ 9.0–9.4 (m, 2 C-Methylgruppen), 7.6 (s, N(CH₃)₂), 5.86 (d, $J = 6$ Hz, 2-H am Hypro), 3.2–3.8 (m, Olefin), 2.5–3.0 (m, Aromaten, N–H).

UV (Methanol): starke „Endabsorption“ mit Schultern bei 280 und 250 nm.

CD (Äthanol): $\Delta\epsilon + 0.4$ (284 nm), -6.6 (234 nm) und -13 (203 nm).

Amphibin-C (3): Die nach der Kristallisation von **1** aus den Fraktionen 210–213 erhaltenen Mutterlaugen wurden auf einer Säule im System A chromatographiert. Die polaren Anteile lieferten nach mehrmaliger SchC im System E 1.12 g *Amphibin-C (3)* als farbloses, amorphes Material. $[\alpha]_D^{20}$: -224° ($c = 0.075$, Methanol).

$C_{36}H_{49}N_5O_5$ Ber. N 11.08

Gef. N 11.02 Mol.-Gew. Ber. 631.3734 Gef. 631.3725 (MS)

IR (CHCl₃): 3390 (NH), 2785 (NCH₃), 1695 (Amide) und 1235/cm (Phenoläther).

NMR (CDCl₃): τ 8.9–9.3 (m, 4 C-Methylgruppen), 7.63 (s, N(CH₃)₂), 5.80 (d, $J = 5.8$ Hz, 2-H am Hypro), 3.2–3.8 (m, Olefin), 2.4–3.0 (m, Aromaten, N–H).

UV (Methanol): starke „Endabsorption“ mit schwachen Schultern bei 252 und 280 nm.

CD (Äthanol): $\Delta\epsilon + 0.9$ (282 nm), -26.9 (237 nm) und -46.6 (204 nm).

Amphibin-D (4): Die Fraktionen 214–218 wurden mittels SC mit System D aufgetrennt. Man erhielt 1.06 g farbloses, amorphes *Amphibin-D*. $[\alpha]_D^{20}$: -203° ($c = 0.09$, Methanol).

$C_{36}H_{49}N_5O_5$ Ber. N 11.08

Gef. N 10.92 Mol.-Gew. Ber. 631.3734 Gef. 631.3706 (MS)

IR (CHCl₃): 3395 (NH), 2790 (NCH₃), 1693 (Amide) und 1235/cm (Phenoläther).

NMR (CDCl₃): τ 9.0–9.4 (m, 4 C-Methylgruppen), 7.55 (s, N(CH₃)₂), 5.76 (d, $J = 5.1$ Hz, 2-H am Hypro), 3.2–3.8 (m, Olefin), 2.6–3.1 (m, Aromaten, N–H).

UV (Methanol): starke „Endabsorption“ mit schwachen Schultern bei 250 und 280 nm.

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon + 0.4$ (290 nm) und -27.9 (237 nm).

Amphibin-E (5): Aus den Fraktionen 241–288 (1.0 g) wurden durch stufenweise SchC mit System B und System E 718 mg *Amphibin-E (5)* als farbloses, amorphes Pulver abgetrennt. $[\alpha]_D^{20}$: -175° ($c = 0.14$, Methanol).

$C_{38}H_{50}N_6O_5$ Ber. N 12.53

Gef. N 12.38 Mol.-Gew. Ber. 670.3843 Gef. 670.3801 (MS)

IR (CHCl₃): 3390 (NH), 2780 (NCH₃), 1691 (Amide) und 1235/cm (Phenoläther).

NMR (CDCl₃): τ 9.0–9.4 (m, 4 C-Methylgruppen), 7.78 (s, N(CH₃)₂), 5.72 (d, $J = 5.3$ Hz, 2-H am Hypro), 3.2–3.8 (m, Olefin), 2.2–3.0 (m, Aromaten, N–H), 1.6 (Indol-N–H?).

UV (Methanol): λ_{\max} 290 (log ϵ 3.68), 281 (3.77), 270 (3.78) und 220 nm (4.66).

CD (Äthanol): $\Delta\epsilon + 1.9$ (285 nm), -26.5 (237 nm) und -83.1 (203 nm).

Hydrierungen: 50 mg des jeweiligen Alkaloids in 20 ccm Methanol wurden über Palladium auf Aktivkohle bei Raumtemperatur unter Normaldruck hydriert. Nach 5–7 Stdn. wurde die Lösung mit 40 ccm Benzol versetzt, über eine mit Kieselgel in Benzol/Methanol gefüllte Filtersäule von Katalysator und Verunreinigungen getrennt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand (95–98% des eingesetzten Alkaloids) wurde über Säulen oder Platten mit System B als Laufmittel chromatographisch gereinigt. Die Hydrierungsprodukte wurden massenspektrometrisch als Dihydro-Derivate identifiziert.

Dihydro-amphibin-B (amorph): IR (Chloroform): 3420 (NH), 2780 (NCH₃), 1640 (Amide) und 1230/cm (Phenoläther).

NMR (CDCl₃): τ 9.0–9.4 (m, 2 C-Methylgruppen), 7.73 (s, N(CH₃)₂), 6.2 (d, $J = 6.8$ Hz, 2-H am Hydro), 2.5–3.2 (m, Aromaten).

CD (Methanol): $\Delta\epsilon = +0.3$ (283 nm), -0.2 (256 nm), -3.6 (229 nm), -25.4 (210 nm) und -30.1 (214 nm).

Hydrolysen: 20 mg des jeweiligen Dihydro-alkaloids wurden mit 2 ccm 6*n* HCl im zugschmolzenen Glasrohr 24 Stdn. auf 120° erhitzt. Das Hydrolysat wurde, nachdem es im Exsikkator über KOH zur Trockne gebracht worden war, in 1.5 ccm Wasser aufgenommen und auf Papier (Schleicher & Schüll, 2043 b) und Celluloseplatten zusammen mit authent. Verbindungen chromatographiert. Dabei wurden folgende Fließmittelsysteme benutzt. System F: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5, obere Phase)²⁰⁾; System G: n-Butanol, gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4²¹⁾; System H: n-Butanol/Benzylalkohol (1:1), gesättigt mit Boratpuffer vom pH 8.4²¹⁾; System J: Butanon/Pyridin/Wasser/Eisessig (70:15:15:2)²²⁾; System K: Butanon/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (40:2:1:6)²³⁾; System L: i-Pentanol/Pyridin/Wasser (35:35:30)²⁰⁾; System M: n-Butanol, gesättigt mit 10proz. Diäthylaminlösung¹²⁾; System N: n-Butanol/Wasser/Aceton/konz. Ammoniak (8:6:1:1)¹²⁾; System O: tert.-Amylalkohol/2.4-Lutidin/Wasser (89:89:57)¹²⁾. Zur Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin sowie der entsprechenden *N,N*-Dimethyl-Derivate eigneten sich besonders die Systeme G und H auf puffer-impregniertem Papier. *Amphibin-E* wurde zusätzlich mit Bariumhydroxid alkalisch hydrolysiert²⁴⁾ und das *Tryptophan* papierchromatographisch mit den Systemen F und L nachgewiesen; die Aminosäure wurde mit Ehrlichs Reagenz sichtbar gemacht.

Nachweis des *trans*-3-Hydroxy-prolins: Ca. 200 mg Amphibin-B, -C, -D oder -E wurden jeweils nach dem Verfahren von Zbiral und Mitarbb.⁹⁾ einer Ozonolyse und anschließenden Hydrolyse unterworfen. Das schwarzbraune Hydrolysat brachte man auf Dowex 50 WX2-Kationenaustauscher; man wusch bis zur neutralen Reaktion des Eluats mit Wasser, danach mit 1*n* Ammoniaklösung. Das mit Ammoniak erhaltene Eluat wurde gesammelt und i. Vak. eingedampft. Es wurde zusammen mit 4-Hydroxy-prolin, *cis*-3-Hydroxy-prolin und *trans*-3-Hydroxy-prolin mit den Systemen M (Laufzeit 100 Stdn.), N (Laufzeit 100 Stdn.) und O (Laufzeit 170–180 Stdn.) auf Papier chromatographiert. Mit Isatin-Reagenz gab 4-Hydroxyprolin nach kurzem Erhitzen eine hellblaue Farbe; Flecke von 3-Hydroxyprolin färbten sich erst nach längerem Erhitzen des Chromatogramms auf 120° grau-rot-violett. Mit Ninhydrin ergaben alle Hydroxyproline eine gelbe Anfärbung. Die R_F -Werte betragen (bez. auf 4-Hydroxy-prolin = 1) für *cis*-3-Hydroxy-prolin und *trans*-3-Hydroxy-prolin im System M 1.75 bzw. 1.20, im System N 1.32 bzw. 1.08 und im System O 0.79 bzw. 1.35.

²⁰⁾ J. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. 1, S. 523, VEB Verlag Gustav Fischer, Jena 1963.

²¹⁾ E. F. McFarren, Analytic. Chem. **23**, 168 (1951).

²²⁾ P. Wollenweber, J. Chromatogr. [Amsterdam] **9**, 369 (1962).

²³⁾ L. Reis, J. Chromatogr. [Amsterdam] **4**, 458 (1960).

²⁴⁾ G. Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, S. 135, W. de Gruyter, Berlin 1966.

Darstellung von cis- und trans-3-Hydroxy-prolin: Zur Lösung von 10 g 5-Phthalimido-*A*2-pentencarbonsäure-(1)-methylester¹⁷⁾ in 200 ccm Methanol tropfte man im Verlauf von ca. 12 Stdn. bei 15° eine 5proz. Lösung von *tert.*-Butylhypochlorit²⁵⁾ in Tetrachlorkohlenstoff hinzu, bis eine Probe des Reaktionsgemisches Kaliumpermanganat nicht mehr entfärbte; je nach Reaktionsdauer wurden 4.5–5.3 g *tert.*-Butylhypochlorit verbraucht. Das Reaktionsgemisch wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit 200 ccm Äther aufgenommen, die Lösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Das nach Eindampfen i. Vak. erhaltene Öl wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert: 6.5 g (53%) 2-Chlor-3-methoxy-5-phthalimido-valeriansäure-methylester (6) vom Schmp. 88–89° (Lit.¹¹⁾: 88–90°.

NMR (CDCl₃): τ 7.9 (m, γ-Methylengruppe), 6.6 (s, –O–CH₃), 6.25 (s, –CO₂CH₃), 6.0–6.4 (m, N–CH₂–CH₂ und –CH₂–CH(OCH₃)–CH), 5.1 (d, J = 6 Hz, >CH–CH(Cl)–CO₂R), 2.25 (Aromatenwasserstoffe).

MS: *m/e* 325 (2%, M⁺), 218 (61%, M – ĆH(Cl)CO₂CH₃), 160 (100%,

C₆H₄(CO)₂N⁺=CH₂).

20 g fein gepulvertes 6 wurden bei 0° in 200 ccm Wasser suspendiert und die Suspension mit 1 *n* NaOH auf pH 11.5–12 gehalten¹²⁾. Nach etwa 6 Stdn. waren 2 Äquivv. NaOH verbraucht und eine fast klare Lösung entstanden. Es wurde filtriert, die Lösung mit 25 ccm konz. Salzsäure versetzt und eine Stde. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 250 ccm Äther extrahiert. Aus der Ätherphase erhielt man 7.3 g (72%) Phthalsäure (IR-Spektrum). Die neutralisierte wäbr. Phase wurde mit einer Lösung von 50 g NaOH in 200 ccm Wasser versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur stengelassen. Dann neutralisierte man mit konz. Salzsäure und dampfte i. Vak. zur Trockne. Der Rückstand wurde zur Abtrennung von NaCl mit 100 ccm Methanol extrahiert. Nach Eindampfen der dunkelbraunen Methanol-Lösung nahm man den Rückstand mit 50 ccm Wasser auf, reinigte über Dowex 50 WX2-Kationenaustauscher (H⁺-Form) und entfärbte mit Aktivkohle. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Methanol/Essigester erhielt man 4.9 g (56%) eines Gemisches von *cis*- und *trans*-3-Methoxy-prolin.

NMR (D₂O): τ 6.1 und 6.16 (je s, O–CH₃ für *cis/trans*-Form), 5.9–6.2 (m, –CH₂–N), 7.3 (m, –CH₂– in 4-Stellung), 5.1–5.4 (m, 2-H und 3-H überlagert).

R_F-Werte auf Celluloseplatten in Pyridin/Wasser (65 : 35): *trans*-3-Methoxy-prolin 0.65, *cis*-3-Methoxy-prolin 0.59.

700 mg Methoxyprolin-Mischung hydrolysierte¹²⁾ man in 48proz. Bromwasserstoffsäure, die mit einigen Milligramm Phenol versetzt worden war, unter Stickstoff. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde über Ionenaustauscher gereinigt und durch SC an Dowex 50 WX2 mit 0.2 *n* Ammoniumformiat-Puffer vom pH 4 als Elutionsmittel aufgetrennt¹⁵⁾. Man erhielt nach Kristallisation aus Äthanol/Wasser 172 mg (entspr. 27%) *trans*-3-Hydroxy-prolin, 243 mg (entspr. 38%) *cis*-3-Hydroxy-prolin und 145 mg Gemisch (insgesamt 87%).

cis-3-Hydroxy-prolin: Zers.-P. 220–230°, Lit.¹²⁾: 225–235°. NMR (D₂O): τ 7.4 (m, –CH₂– in 4-Stellung), 6.0 (m, –CH₂–N), 5.45 (d, J = 4.0 Hz, 2-H), 4.8 (3-H, durch H₂O überlagert).

trans-3-Hydroxy-prolin: Zers.-P. 225–230°, Lit.¹²⁾: 224–230°. NMR (D₂O): τ 7.4 (m, –CH₂– in 4-Stellung), 6.0 (m, –CH₂–N), 5.38 (d, J = 1.0 Hz, 2-H), 4.8 (3-H durch H₂O überlagert).

Die Identität beider Substanzen wurde zusätzlich durch vergleichende Chromatographie mit authent. Substanzproben (*Sheehan*) gesichert.

²⁵⁾ H. M. Teetov und E. W. Bell, *Org. Syntheses* 32, 20 (1952).