

Rudolf Tschesche, Samuel T. David, J. Uhlendorf und Hans-Wolfram Fehlhaber *)

Alkaloide aus Rhamnaceen, XV¹⁾

Mucronin-D, ein weiteres cyclisches Peptid-Alkaloid aus *Zizyphus mucronata* Willd.

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 24. April 1972)

Aus dem Rinden-Extrakt von *Zizyphus mucronata* Willd. wurde neben den bereits beschriebenen Alkaloiden Mucronin-A, -B und -C²⁾ (1–3) als Hauptkomponente ein weiteres cyclisches Peptid-Alkaloid, Mucronin-D (4), isoliert und die Struktur geklärt. Mucronin-D unterscheidet sich von allen bisher bekannten Peptid-Alkaloiden³⁾ durch ein 13gliedriges Ringsystem, das von den Aminosäuren *trans*-3-Hydroxy-prolin und Isoleucin sowie von 5-Hydroxy-2-methoxy-styrylamin gebildet wird.

Alkaloids from Rhamnaceae, XV¹⁾

Mucronine-D, a further Peptide Alkaloid from *Zizyphus mucronata* Willd.

Apart from the already reported alkaloids Mucronine-A, -B and -C²⁾ (1–3) from the bark-extract of *Zizyphus mucronata* Willd., a further cyclic peptide alkaloid, Mucronine-D (4), has been isolated as the main component and its structure elucidated. Mucronine-D differs from the other peptide alkaloids³⁾ hitherto known containing a 13-membered ring system formed by the amino acids *trans*-3-hydroxyproline, isoleucine, and 5-hydroxy-2-methoxy-styrylamine.

In einer früheren Mitteilung²⁾ haben wir die Isolierung und Strukturaufklärung der drei Peptid-Alkaloide Mucronin-A, -B und -C (1–3) aus (zwei unterschiedlichen Chargen von) *Zizyphus mucronata* Willd. beschrieben. Aus dem Rohbasengemisch einer in Mali gesammelten Droge (Charge I aus l. c.²⁾) konnten wir nun durch mehrstufige präparative Schichtchromatographie das Hauptalkaloid Mucronin-D (4) abtrennen.

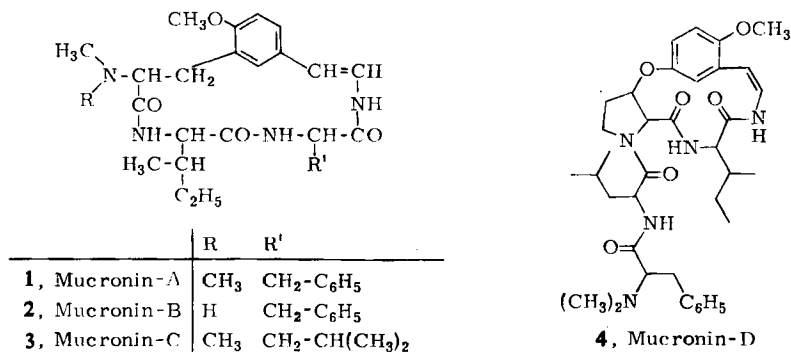
*) Neue Anschrift: Farbwerke Hoechst AG, Pharma-Synthese, D-6230 Frankfurt 80.

¹⁾ XIV. Mittel.: R. Tschesche, H. Wilhelm und H.-W. Fehlhaber, *Tetrahedron Letters* [London] 1972, 2609.

²⁾ H.-W. Fehlhaber, J. Uhlendorf, S. T. David und R. Tschesche, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.

³⁾ Vgl. E. W. Warnhoff, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* [Wien] XXVIII, 162 (1971); M. Pais und F.-X. Jarreau in B. Weinstein (Herausgeber), *Chemistry and Biochemistry of Aminoacids, Peptides and Proteins*, Bd. 1, S. 127, M. Dekker, Inc., New York 1971.

Die Summenformel von Mucronin-D ergab sich durch hochauflösende Massenspektrometrie und durch Elementaranalyse zu $C_{37}H_{51}N_5O_6$. Das Alkaloid ergab mit Dragendorffs Reagenz eine gelbe, mit 30proz. Schwefelsäure eine dunkelbraune Färbung. Rasche Entfärbung alkalischer Kaliumpermanganat-Lösung wies auf eine C=C-Doppelbindung hin.



Absorptionsspektren

Das IR-Spektrum von Mucronin-D ähnelt dem der anderen Peptid-Alkaloide³⁾. Es zeigt typische Banden für sekundäre Amide (3400, 1680 und 1640/cm), für *O*-Methyl- (2820) und *N*-Methylgruppen (2770) sowie für eine konjugierte C=C-Doppelbindung (1610). Banden bei 1210 und 1025/cm lassen sich der Phenoläther-Gruppierung zuordnen.

Im UV-Spektrum treten Absorptionsmaxima auf bei 268 nm ($\lg \epsilon$ 4.06) und 320 nm ($\lg \epsilon$ 3.76). Nach Lage und Intensität stimmen diese Banden gut mit den für ein 2.5-Dialkoxy-styrylamin-System zu erwartenden⁴⁾ überein. Das durch katalytische Hydrierung leicht zugängliche Dihydro-mucronin-D gibt die für Hydrochinonäther typische Absorption^{4,5)} bei 290 nm. Das CD-Spektrum von 4 zeigt stark negative Maxima bei 324, 276, 254 und 218 nm sowie ein schwach positives Maximum bei 232 nm; es unterscheidet sich damit deutlich von den Spektren der 14gliedrigen Cyclopeptid-Alkaloide, die einen negativen Cotton-Effekt um 239 und einen schwach positiven um 286 nm aufweisen⁶⁾.

Im NMR-Spektrum erkennt man je ein Singulett bei τ 7.67 und 6.2 für die *N,N*-Dimethyl- bzw. die *O*-Methylgruppe. Ferner tritt im Bereich τ 9.2–8.95 ein Signal-komplex für vier C-Methylgruppen und bei τ 4.1 ein Dublett ($J = 9$ Hz) für ein Proton eines *cis*-Olefins auf.

Massenspektren

Das Massenspektrum von Mucronin-D (Abbild. 1) ist weitgehend analog zu den Spektren der Peptidalkaloide Amphibin-B bis -E⁷⁾, die ebenfalls 3-Hydroxy-prolin

⁴⁾ E. Zbiral, E. L. Ménard und J. M. Müller, *Helv. chim. Acta* **48**, 404 (1965).

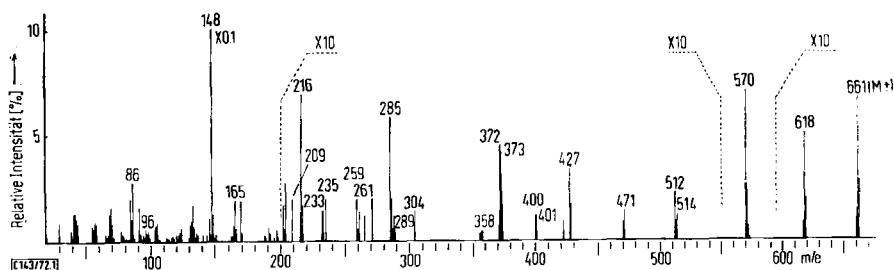
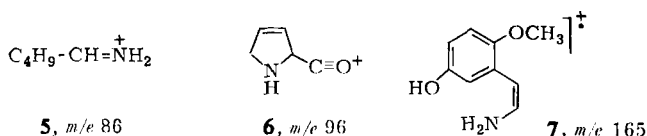
⁵⁾ A. Kiss, J. Molnar und C. Sandorfy, *Bull. Soc. chim. France* **1949**, 275.

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

⁷⁾ R. Tschesche, E. U. Kaufmann und H.-W. Fehlhaber, *Chem. Ber.* **105**, 3094 (1972), vorstehend.

enthalten, aber, bedingt durch das Vorliegen einer *p*-Hydroxystyrylamin-Einheit, ein 14gliedriges Ringsystem aufweisen. Von allen nachstehend genannten Ionen wurden mittels hochauflösender Massenspektrometrie die Summenformeln und damit deren Identität gesichert.

Die einzelnen Untereinheiten des Moleküls lassen sich an charakteristischen Peaks im unteren Massenbereich erkennen: Der *Basispeak* (vgl. Abbild. 1) kennzeichnet das Aminfragment (a, s. Tab. 1) des endständigen *N,N*-Dimethyl-phenylalanins. Das Aminfragment *m/e* 86 (5) deutet auf Leucin bzw. Isoleucin, das Ion *m/e* 96 (6) auf Hydroxyprolin, und das Ion *m/e* 165 (7) ist der substituierten Hydroxystyrylamin-Einheit zuzuschreiben.



Abbild. 1. Massenspektrum von Mucronin-D (4)

Von den durch stufenweisen Abbau der Seitenkette und durch Spaltungen im Ringsystem gebildeten Fragmenten (Tab. 1) sind für die Strukturzuordnung vor allem jene von Bedeutung, die aus jeweils zwei Untereinheiten bestehen: So zeigen die Ionen l und m, daß *N,N*-Dimethyl-phenylalanin mit einer Leucin-Einheit⁸⁾ verbunden ist, während n und o deren Verknüpfung mit dem Hydroxyprolin angeben; aus dem Bruchstück p folgt, daß das Hydroxyprolin an der Carboxylgruppe eine zweite Leucin-Einheit⁸⁾ trägt; r, s und t belegen die Ätherbindung zwischen Hydroxyprolin und der Styrylamin-Gruppierung; da das Ion u die Styrylamin- und eine Leucin-Einheit enthält, ist damit die Cyclopeptidstruktur vervollständig. — Das Massenspektrum von Dihydro-mucronin-D ist analog; soweit die Fragmente die Styrylamin-Gruppierung aufweisen, erscheinen sie um +2 Masseneinheiten verschoben.

⁸⁾ Eine Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin an dieser Stelle des Moleküls erlaubt das Massenspektrum nicht; vgl. H.-W. Fehlhaber, Z. analyt. Chem. 235, 91 (1968).

Tab. 1. Charakteristische Bruchstück-Ionen im Massenspektrum von Mucronin-D. (In den Formeln steht X für das 13gliedrige Ringsystem einschließlich 3-Hydroxy-prolin)




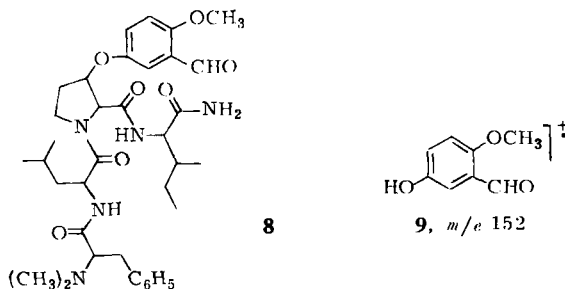
| Ion ⁺) | Struktur | m/e |
|--------------------|--|-----|
| a | $\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ | 148 |
| b | $\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N}^+=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{X} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}$ | 570 |
| c | $\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{X}]^{\ddagger}$ $ $ C_4H_9 | 514 |
| d | $\text{OCN}-\text{CH}-\text{CO}-\text{X}]^{\ddagger}$ $ $ C_4H_9 | 512 |
| e | $\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{CH}=\text{C}-\text{X}]^{\ddagger} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}$ | 471 |
| f | $\text{OHC}-\text{X}]^{\ddagger}$ | 401 |
| g | $^+\text{O}=\text{C}-\text{X}$ | 400 |
| i | $\text{H}-\text{X}]^{\ddagger}$ | 373 |
| j | X^+ | 372 |
| k | $\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{N}^+ \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \quad \quad \quad \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}$  | 358 |
| l | $\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{C}\equiv\text{O}^+ \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \quad \quad \quad \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}$ | 289 |
| m | $\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}^+=\text{CH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \quad \quad \quad \text{C}_4\text{H}_9 \end{array}$ | 261 |
| n | $\text{H}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{N}^+]$  $ $ C_4H_9 | 209 |
| o | $\begin{array}{c} \text{OCN}-\text{CH}-\text{CO}-\text{N} \\ \quad \quad \quad \\ \text{C}_4\text{H}_9 \quad \quad \quad ^+\text{O}=\text{C} \end{array}$  | 235 |

Tabelle 1 (Fortsetzung)

| Ion ⁺) | Struktur | m/e |
|--------------------|----------|-----|
| p | | 209 |
| r | | 259 |
| s | | 233 |
| t | | 216 |
| u | | 304 |

Oxydative Spaltung der C=C-Doppelbindung

Mit $\text{OsO}_4/\text{NaJO}_4$ in wäßrigem Aceton⁹⁾ ließ sich die Enamidgruppierung oxydativ zur Dicarboxylverbindung spalten, die unter den angewandten Reaktionsbedingungen zum Amido-aldehyd **8** hydrolysierte. Die Identität von **8** wurde durch das Massenspektrum sichergestellt, das einen Molekülpeak bei m/e 665 und Hauptfragmentpeaks



^{+) Die Bezeichnung der Ionen entspricht der in l. c.⁷⁾ verwandten.}

^{9) R. Pappo, D. S. Allen jr., R. U. Lemieux und W. S. Johnson, J. org. Chemistry **21**, 478 (1956).}

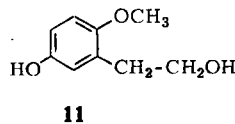
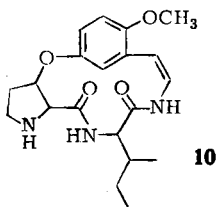
entsprechend den Bruchstück-Ionen **a** (vgl. Tab. 1) und **9** aufweist. Die Bildung von **8** bedeutet eine weitere Stütze für die Cyclopeptid-Struktur, da beim Vorliegen eines linearen Systems eine Verbindung mit erheblich geringerem Molekulargewicht hätte entstehen müssen. Das UV-Spektrum des Aldehyds gleicht sowohl in neutraler als auch in saurer methanolischer Lösung dem von 2.5-Dimethoxy-benzaldehyd (Tab. 2), womit ein weiterer Hinweis auf die Substitution der Styrylamin-Einheit in **4** vorlag.

Tab. 2. UV-Spektren von **8** und 2.5-Dimethoxy-benzaldehyd (λ nm, in Klammern sind die relativen Extinktionen angegeben)

| | 8 | 2.5-Dimethoxy-benzaldehyd ¹⁰⁾ |
|--|------------|--|
| in Methanol | 345 (0.15) | 352 (0.27) |
| | 253 (0.34) | 256 (0.49) |
| | 223 (1.0) | 225 (1.0) |
| in Methanol + H ₂ SO ₄ | 291 (0.13) | 295 (0.24) |
| | 226 (0.56) | 227 (0.53) |

Hydrolysen

Nach einer Totalhydrolyse von Dihydro-mucronin-D mit 6*n* HCl im Bombenrohr bei 110° wurden im Hydrolysat durch chromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen Leucin, Isoleucin und *N,N*-Dimethyl-phenylalanin nachgewiesen. Da also Leucin und Isoleucin nebeneinander vorlagen, wurde zur Klärung der Frage, welche dieser beiden isomeren Aminosäuren in die Seitenkette bzw. welche in das Ringsystem eingebaut ist, eine Partialhydrolyse vorgenommen. Durch Erhitzen in einem Gemisch von halbkonz. Salzsäure und Eisessig (2:1) und chromatographische Auftrennung der Reaktionsprodukte konnte als Hauptkomponente eine Verbindung isoliert werden, der laut Massenspektrum die Seitenkette fehlte (**10**). Nach einer anschließenden Totalhydrolyse wurde allein Isoleucin identifiziert. Damit ist sichergestellt, daß Isoleucin dem Ring, Leucin der Seitenkette angehören.



Zum Nachweis des 3-Hydroxy-prolins, das bei der sauren Hydrolyse des Alkaloids zerstört wird (vgl. I. c. 4,7)) wurde Mucronin-D einer Ozonolyse unterworfen und das Reaktionsprodukt anschließend mit Bromwasserstoff hydrolysiert. Im Hydrolysat wurde durch Vergleich mit authentischen Verbindungen eindeutig *trans*-3-Hydroxy-prolin nachgewiesen.

Um die Stellung der Substituenten am Benzolring des Styrylamins zu beweisen, wurde eine reduzierende alkalische Hydrolyse nach Zbiral et al.⁴⁾ durchgeführt. Danach konnte β -[5-Hydroxy-2-methoxy-phenyl]-äthylalkohol (**11**) isoliert werden,

¹⁰⁾ E. P. Crowell, W. A. Powell und C. J. Varsel, *Analytic Chem.* **35**, 184 (1963).

dessen Identität durch Mischschmelzpunkt sowie chromatographische und spektroskopische Vergleiche mit authentischem Material¹¹⁾ gesichert wurde. Die Methoxygruppe befindet sich also in *ortho*-Stellung zur Enamid-Gruppierung in **4**; demnach liegt im Mucronin-D 5-Hydroxy-2-methoxy-styrylamin als Molekülbaustein und somit ein 13 gliedriger Ring vor (**4**).

Wir danken Herrn P. Garnier, Montpellier, für die Beschaffung der Droge. 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-Spektroskop HX 90 (NMR), Cary 14 (UV) und Dichrographe-2 von 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. Die Elementaranalysen führte das Mikrochemische Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, aus.

Zur Dünnschichtchromatographie benutzte man Kieselgel HF₂₅₄ (Merck) oder Cellulose (Excorna, Mainz), zur präparativen Schichtchromatographie Kieselgel PF₂₅₄ (Merck), zur Papierchromatographie die Sorte 2043b (Schleicher & Schüll) und zur Säulenchromatographie ungesiebertes Kieselgel (Gebr. Herrmann, Köln).

Isolierung von Mucronin-D (4): 12.7 kg getrockneter Rinde von *Zizyphus mucronata* Willd. wurden fein zerkleinert und in Portionen von 500 g viermal mit je 3 l Methanol ausgezogen. Die Extrakte wurden i. Vak. bis zur sirupösen Konsistenz eingeeengt, mit dem doppelten Vol. Wasser verdünnt, mit konz. Ammoniak auf pH 9 gebracht und fünfmal mit je 500 ccm Benzol ausgeschüttelt. Nach Extraktion der organischen Phase mit je 300 ccm 5proz. wäfr. Citronensäure wurde erneut ammoniakalisch gemacht und viermal mit je 300 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man 10.8 g (0.085%) Rohalkaloid. Zur Vortrennung wurde das Alkaloidgemisch im System Chloroform/Methanol (95 : 5) zweimal entwickelt und in vier Fraktionen zerlegt, die nach steigenden *R_F*-Werten A, B, C und D benannt wurden²⁾. Die Komponente C (2.5 g) wurde durch wiederholte, jeweils zweimalige Entwicklung im System Chloroform/Essigester/Methanol (48 : 7 : 2) weitgehend von Farbstoffen befreit. Nach anschließender mehrmaliger Entwicklung mit Benzol/Aceton/Methanol (40 : 10 : 1) erhielt man 1.4 g **4** als farbloses amorphes Pulver. [α]_D²⁰: -487° (c = 0.12, CHCl₃).

C₃₇H₅₁N₃O₆ (661.8) Ber. C 67.14 H 7.77 N 10.58 O-CH₃+N-CH₃ 6.80
 Gef. C 66.43 H 7.76 N 10.09 O-CH₃+N-CH₃ 6.53
 Mol.-Gew. Ber. 661.3839 Gef. 661.3826 (MS)

IR (CHCl₃): 3400 (NH), 2820 (OCH₃), 2770 (NCH₃), 1680, 1640 (Amide), 1610 (C=C), 1210 und 1025/cm (Phenoläther).

UV (Methanol): λ_{\max} 268 (lg ϵ 4.06), 320 nm (3.76).

¹¹⁾ Herrn Prof. Dr. E. Zbiral, Wien, danken wir für die freundliche Überlassung einer Vergleichsprobe von **11** und des Isomeren β -[2-Hydroxy-5-methoxy-phenyl]-äthylalkohol.

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon = -14.02$ (324 nm), -18.28 (276 nm), -29.53 (254 nm), $+3.13$ (232 nm), -14.50 (219 nm).

NMR (CDCl₃): τ 9.2–8.95 (4 C-CH₃), 8.8–8.4 (3 –CH₂–), 7.67 (s, N(CH₃)₂), 6.2 (s, OCH₃), 4.6 (m, 3-H am Hypro), 4.1 (d, $J = 9$ Hz, 1 Olefinproton), 2.9–1.6 (m, Aromaten + NH + 1 Olefinproton), 1.4 (m, 1 NH).

Dihydro-mucronin-D: 250 mg **4** in 50 ccm Methanol wurden über Pd(10%) auf Aktivkohle bei Raumtemperatur unter Normaldruck hydriert. Nach 3 Stdn. wurde vom Katalysator abfiltriert, i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand an Kieselgel im System Chloroform/Methanol (94 : 6) bei zweimaliger Entwicklung gereinigt. *Dihydro-mucronin-D* kristallisierte aus Methylenchlorid/Äther in feinen Nadeln vom Schmp. 247°; $[\alpha]_D^{20} = -225^\circ$ ($c = 0.17$, CHCl₃).

C₃₇H₅₃N₅O₆ Mol.-Gew. Ber. 663.3996 Gef. 663.3956 (MS)

UV (Methanol): λ_{\max} 290 (lg ϵ 3.57), Schulter bei 227 nm (4.15).

IR (CHCl₃): 3415 (NH), 2825 (OCH₃), 2780 (NCH₃), 1660 (Amide), 1230, 1040/cm (Phenol-äther).

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon = -56.90$ (227 nm), -0.64 (297 nm).

Totalhydrolyse von Dihydro-mucronin-D: 20 mg *Dihydro-mucronin-D* wurden mit 1 ccm 6n HCl in ein dickwandiges Glasrohr eingeschmolzen und 18 Stdn. auf 110° erhitzt. Das Hydrolysat wurde i. Vak. über KOH getrocknet und mit 1 ccm Wasser aufgenommen. Zum chromatographischen Vergleich mit authent. Verbindungen verwendete man folgende Systeme. A: Butanon/Pyridin/Wasser/Eisessig (70 : 15 : 15 : 2)¹²⁾; B: 95proz. tert.-Butylalkohol/Borat-Puffer vom pH 8.4 (85 : 15)¹³⁾; C: n-Butanol, gesättigt mit Citrat-Puffer vom pH 4¹⁴⁾. Mit System A wurde auf Celluloseplatten, mit den Systemen B und C auf imprägniertem Papier im Durchlaufverfahren (Laufzeiten 67 bzw. 20 Stdn.) chromatographiert.

Partialhydrolyse von Dihydro-mucronin-D: 140 mg *Dihydro-mucronin-D* wurden in einer Mischung von 5 ccm konz. Salzsäure, 5 ccm Eisessig und 5 ccm Wasser 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abgezogen, die Hydrolysenprodukte wurden chromatographisch im System Methylenchlorid/Methanol (45 : 5) getrennt. 34 mg des Hauptproduktes **10** wurden isoliert.

C₂₀H₂₇N₃O₄ (373.4) Mol.-Gew. Gef. 375 (MS)

Totalhydrolyse von 10: 16 mg **10** wurden mit 6n HCl im Bombenrohr bei 120° hydrolysiert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde durch chromatographischen Vergleich in den Systemen A, B und C mit authent. Substanzen *Isoleucin* identifiziert.

Alkalische Hydrolyse von Mucronin-D (4): 627 mg **4** wurden in 50 ccm Methanol und 50 ccm 2n NaOH gelöst. Man fügte 1 g NaBH₄ hinzu und ließ die Mischung 17 Stdn. unter Rückfluß kochen. Anschließend wurde i. Vak. weitgehend eingedampft und mit Wasser aufgenommen. Zur Zerstörung überschüss. Reduktionsmittels wurden 20 ccm Eisessig und 2 ccm konz. Salzsäure hinzugefügt. Es wurde i. Vak. eingedampft, mit Wasser aufgenommen und mit konz. Ammoniak auf pH 9 eingestellt. Man extrahierte nacheinander mit 100 ccm Methylenchlorid, 100 ccm Essigester und zweimal mit 100 ccm Methylenchlorid, trocknete die vereinigten organischen Phasen und dampfte i. Vak. zur Trockne ein. Der ölige Rückstand

¹²⁾ A. R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. chim. Acta **44**, 2022 (1961).

¹³⁾ J. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, S. 528, 533, 959, G. Fischer Verlag, Jena 1963.

¹⁴⁾ E. F. McFarren, Analytic. Chem. **23**, 168 (1951).

wurde an 15 g Kieselgel mit Methylchlorid/Äther (1:1) chromatographiert. Das Hauptprodukt wurde durch präparative Schichtchromatographie mit dem System Benzol/Aceton (7:1) gereinigt und aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Man erhielt 97 mg **11** vom Schmp. 99–100° (Lit.⁴): 98–100°. Die Verbindung war nach Mischprobe, chromatographischem und IR-spektroskopischem Vergleich identisch mit authentischem Material.

Nachweis des trans-3-Hydroxy-prolins: 40 mg Dihydro-mucronin-D wurden nach dem Verfahren von Zbiral und Mitarbb.⁴) einer Ozonolyse und anschließender Hydrolyse mit 48proz. Bromwasserstoffsäure unterworfen.

Es wurde im Vergleich zusammen mit 4-Hydroxy-prolin, cis-3-Hydroxy-prolin und trans-3-Hydroxy-prolin mit den Systemen tert.-Amylalkohol/2.4-Lutidin/Wasser¹⁵) (178:178:110) und n-Butanol, gesättigt mit 10proz. Diäthylamin¹⁶) auf Papier chromatographiert (Laufzeit jeweils 96 Stdn.). Mit Isatin-Reagenz gab 4-Hydroxy-prolin nach kurzem Erhitzen eine hellblaue Farbe, während 3-Hydroxy-prolin erst nach längerem Erhitzen auf 120° grau-rotviolett färbte. Aufgrund der R_F -Werte wurde im Hydrolysat trans-3-Hydroxy-prolin identifiziert.

*Oxydative Spaltung der Doppelbindung in 4*⁹): Zu einer Lösung von 130 mg Mucronin-D (**4**) in 20 ccm Aceton + 15 ccm Wasser wurden ca. 8 mg OsO₄ gegeben und dann innerhalb von 30 Min. 90 mg NaJO₄ (210 Mol-%) unter ständigem Rühren bei 24° eingetragen. Man rührte noch weitere 90 Min., engte die Mischung i. Vak. ein und extrahierte sie fünfmal mit je 10 ccm Methylchlorid. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen und Eindampfen i. Vak. erhielt man 135 mg dunkelbraun gefärbtes Oxydationsprodukt. Die Reinigung durch präparative Schichtchromatographie mit Chloroform/Methanol (94:6, zweimalige Entwicklung) lieferte 30 mg Amido-aldehyd **8**, der aus Benzol/Petroläther (40–60°) in derben, farblosen Kristallen vom Schmp. 93–95° erhalten wurde: $[\alpha]_D^{20}$: –20° (c = 0.1; CHCl₃).

IR (CHCl₃): 3330 (NH), 2815 (OCH₃), 2770 (NCH₃), 2720, 1670 (Aldehyd), 1665 (Amide), 1255, 1020/cm (Phenoläther).

UV (Methanol): λ_{\max} (log ϵ) 345 (3.54), 253 (3.94), 223 nm (4.40).

NMR (CDCl₃): τ 9.1 (m, –C–CH₃), 7.65 (s, N(CH₃)₂), 6.13 (d, –OCH₃), 5.3 (CH von trans-3-Hydroxyprolin), 4.9 (O–CH von trans-3-Hydroxyprolin), 4.0, 3.6, 2.52 (Amid-NH), 2.8 (m, 8 Aromatenprotonen), –0.2 (CHO).

C₃₆H₅₁N₅O₇ (665.8) Ber. N 10.52 Gef. N 10.21

¹⁵ F. Irreverre, K. Morita, A. V. Robertson und B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. **85**, 2824 (1963).

¹⁶ J. C. Sheehan, J. G. Whitney, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3863 (1963).