

Iridoide, VI¹⁾

Enzymatische Spaltung von Secologanin Ein Modell zur Biogenese der Indolalkaloide²⁾

Günther Kinast und Lutz-F. Tietze*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster,
Orléans-Ring 23, D-4400 Münster

Eingegangen am 15. März 1976^{*)}

Die enzymatische Spaltung der glycosidischen Bindung in Secologanin (**1**) führte unter Isomerisierung und Bildung einer α,β -ungesättigten Aldehydgruppe mit (*E*)-Konfiguration zu dem Epimeren-Gemisch **10a**, das mit Acetanhydrid/Pyridin die Acetate **10b** lieferte. Das bei der Umsetzung erwartete Primärprodukt **8** wurde nicht gefunden.

Iridoids, VI¹⁾

Enzymatic Cleavage of Secologanin

A Model for the Biosynthesis of the Indole Alkaloids²⁾

The enzymatic cleavage of the glycosidic linkage in secologanin (**1**) afforded by isomerisation and formation of an α,β -unsaturated aldehyde group with (*E*)-configuration the epimeric mixture **10a**, which was converted by acetic anhydride/pyridine into the acetates **10b**. The primarily expected product **8** could not be discovered in the cleavage reaction.

Das Secoiridoid-glycosid Secologanin (**1**) ist eine Schlüsselverbindung in der Biogenese der Indolalkaloide vom Typ Corynanthe, Aspidosperma und Iboga sowie weiterer Naturstoffe³⁾. Durch Fütterungsversuche konnte gezeigt werden, daß **1** mit Tryptophan (**2**) (Tryptamin) zu Vinosid (**3a**), der ersten stickstoffhaltigen Vorstufe der Indolalkaloide, kondensiert. Nachfolgende Spaltung der glycosidischen Bindung sowie reduktive Kondensation von C-21 mit N-4 führen zum Geissoschizin (**6**), dem Prototyp der Corynanthe-Gruppe. Im Verlauf der Umwandlung erfolgt hierbei Isomerisierung an C-3 und stereospezifische prototrope Verschiebung zu einer olefinischen Doppelbindung mit (*E*)-Konfiguration. Geissoschizin (**6**) ist die Vorstufe der Indolalkaloide vom Typ Iboga und Aspidosperma. Der isomere Corynanthe-aldehyd (**5**) scheint dagegen nicht auf dem direkten Biogeneseweg zu liegen⁴⁾. Die stereospezifische Isomerisierung der Vinylgruppe in **3a** muß daher entweder auf der Stufe des potentiellen Iminiumsalzes **7** oder aber schon bei der Spaltung der glycosidischen Bindung von **3a** zu **3b** \rightleftharpoons **4** erfolgen.

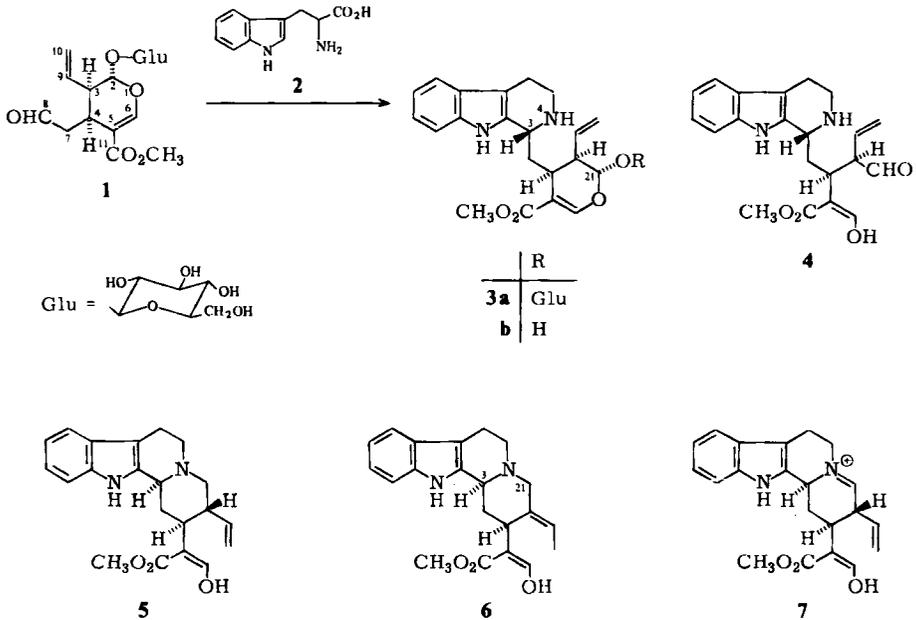
^{*)} Ergänzte Fassung eingegangen am 25. März 1976.

¹⁾ V. Mitteil.: G. Kinast und L.-F. Tietze, Chem. Ber. 109, 3626 (1976), vorstehend.

²⁾ Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht: L.-F. Tietze, Habilitationsarbeit Münster 1975.

³⁾ A. R. Battersby in The Alkaloids, Chem. Soc. Spec. Period. Rep. 1, 31 (1971); A. I. Scott und Siu-Leung Lee, J. Amer. Chem. Soc. 97, 6906 (1975).

⁴⁾ A. A. Qureshi und A. I. Scott, Chem. Commun. 1968, 948; A. R. Battersby, J. C. Byrne, R. S. Kapil, J. A. Martin, T. G. Payne, D. Arigoni und P. Loew, ebenda 1968, 951.



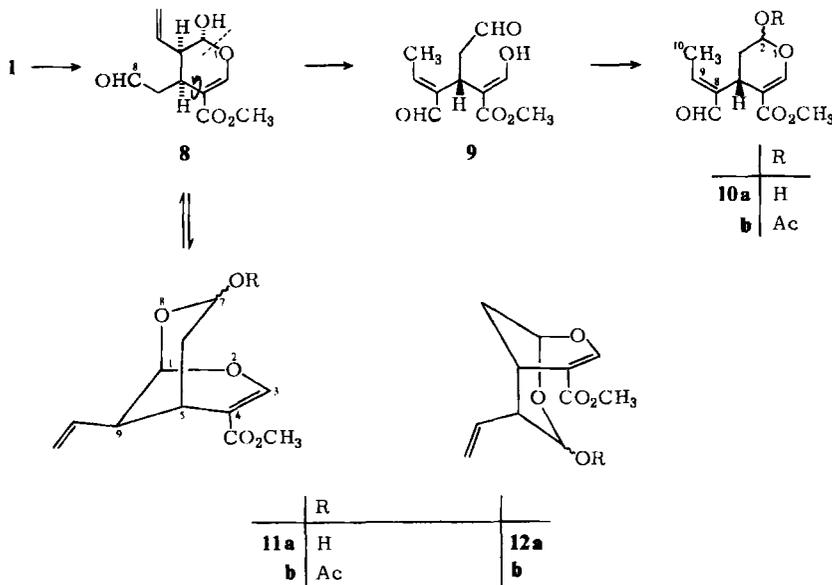
Um diese Möglichkeiten der Isomerisierung zu prüfen, haben wir die enzymatische Spaltung der glycosidischen Bindung in Secologanin (1) untersucht. Das für die Versuche benötigte 1 wurde durch Extraktion aus *Lonicera tatarica*⁵⁾ erhalten und über das Acetat eindeutig charakterisiert. Zur Spaltung der glycosidischen Bindung wurde mit Emulsin in einem Citratpuffer (pH 5.2) bei 25°C umgesetzt. Um auch Intermediärprodukte abfangen zu können, führte man mehrere Versuche durch, die nach bestimmten Zeitintervallen unterbrochen wurden. Bei Verwendung gleicher Gewichtsmengen an Emulsin und Secologanin (1) erhielt man schon nach wenigen Minuten als einziges Produkt den Bicyclus 11a, der mit Acetanhydrid/Pyridin die Acetate 11b ergab⁶⁾. Bei längeren Reaktionszeiten trat langsame Umwandlung von 11a in das Gemisch der epimeren Aglycone 10a ein, die mit Acetanhydrid/Pyridin die entsprechenden Acetate 10b lieferten.

Verwendete man bei der Glycosidspaltung nur 1/10 Gewichtsäquivalent an Emulsin, so verlief die Umsetzung verhältnismäßig langsam. Hierbei erhielt man nach 6 Tagen neben nicht umgesetztem Secologanin (1) als Hauptprodukt die epimeren Aglycone 10a. Das in erster Linie erwartete Aglycon 8 konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Man muß daher annehmen, daß das primär gebildete Aglycon 8 in einer schnellen, reversiblen Reaktion unter Erhaltung des Dihydropyran-Ringes den Bicyclus 11a bildet, der dann in einer langsamen Reaktion über 8 und den offenkettigen Trialdehyd 9 zu dem thermodynamisch stabileren Produkt 10a mit (E)-Konfiguration der C-8,9-

⁵⁾ I. Souza und H. Mitsuhashi, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 191.

⁶⁾ Kürzlich untersuchte auch R. T. Brown die Umsetzung von Secologanin mit Emulsin. R. T. Brown und C. L. Chapple, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 787.

Doppelbindung isomerisiert. Das (*Z*)-Isomere von **10a** wurde nicht erhalten⁷⁾. Hierbei ist die Frage noch ungeklärt, ob es sich bei der Isomerisierung der β,γ - in die α,β -ungesättigte Aldehydfunktion mit (*E*)-Konfiguration um eine stereospezifische prototrope Verschiebung oder aber um eine Isomerisierung eines intermediären (*E,Z*)-Gemisches von **10a** in das thermodynamisch stabilere Produkt handelt⁸⁾.



Die Untersuchungen zeigen, daß die Isomerisierung der β,γ -ungesättigten Aldehydgruppe des Secologanin-Bausteins in **3b** \rightleftharpoons **4** prinzipiell möglich ist. Hierbei sollte sich bevorzugt eine olefinische Doppelbindung mit (*E*)-Konfiguration ausbilden, wie sie auch im Geissoschizin (**6**) vorliegt.

Diskussion der spektroskopischen Daten

Konstitution und Konfiguration der einzelnen Verbindungen sind spektroskopisch abgesichert. In den IR-Spektren von **10a** und **b** findet man die Signale für die α,β -ungesättigte Aldehydgruppe bei 1690 cm^{-1} , im IR-Spektrum von **11a** fehlen dagegen die charakteristischen Aldehydabsorptionen. Die Massenspektren ergeben Molekülionen $m/e = 226, 268$ und 226 , deren Hochoauflösung auf die Summenformeln $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$, $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6$ und $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$ zutrifft. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **10a** und **b** zeigen für das Aldehydproton ein Singulett bei $\delta = 9.29$ bzw. 9.34 ppm. Daraus ergibt sich für die C-8,9-Doppelbindung die (*E*)-Konfiguration, da bei Vorliegen der (*Z*)-Konfiguration Signale bei $\delta = 10.1$ ppm zu erwarten sind⁸⁾. In Übereinstimmung hierzu findet man für die C-10-Methylgruppe in **10a** ein Dublett bei $\delta = 1.98$ ppm ($J = 7$ Hz). Dieser Wert

⁷⁾ Bei einigen Versuchen zur Glycosidsplattung fand man im $^1\text{H-NMR}$ des Rohextraktes ein schwaches Singulett (ca. 0.05 CH) bei $\delta = 10.1$ ppm, das eventuell auf das Vorliegen des (*Z*)-Isomeren von **10a** deutet.

⁸⁾ K. C. Chan, R. A. Jewell, W. H. Nutting und H. Rapoport, J. Org. Chem. **33**, 3382 (1968).

entspricht den von *Jackman*⁹⁾ gefundenen Ergebnissen über die shielding-Effekte durch β -Aldehydgruppen.

Für 2-H in **10a** beobachtet man ein Triplett bei $\delta = 5.46$ ppm ($J = 4$ Hz) – das 2-H-Signal der an C-2 isomeren Verbindung konnte aufgrund der geringen Intensität nicht eindeutig bestimmt werden – und in **10b** zwei Triplets bei $\delta = 6.37$ ($J = 3$ Hz) und 6.25 ppm ($J = 5$ Hz). Aufgrund der Multiplizität und der Kopplungskonstanten muß für die Hydroxy- und Acetoxygruppe an C-2 eine axiale Stellung angenommen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit dem anomeren Effekt¹⁰⁾.

Im ¹H-NMR-Spektrum von **11a** findet man die Vinylprotonen im Bereich von $\delta = 6.4$ –5.2 und 7-H als doppeltes Dublett bei $\delta = 5.10$ ppm ($J = 10$ Hz und $J = 4$ Hz). Zum Beweis, daß **11a** und nicht das Isomere **12a** vorlag, das aus **8** durch Öffnung des Dihydropyranringes und Ringschluß von C-8 mit O-1 entstanden sein könnte, wurden Doppelresonanz-Experimente und Versuche mit Shift-Reagenzien an dem Acetat **11b** durchgeführt. So findet man Kopplung der Methylenprotonen mit 7-H; in **12b** sollte eine solche Kopplung nicht auftreten. Bei Zugabe von [Eu(fod)₃] beobachtet man eine starke Verschiebung der Resonanzfrequenzen von 3-H, 5-H, 6-H₂ und 7-H nach tieferem Feld. 7-H wird hier als doppeltes Dublett ($J = 9$ Hz und $J = 5$ Hz) erkennbar. Eine starke Verschiebung der Absorption des α -Vinyl-H, wie dies für **12b** zu erwarten wäre, findet man dagegen nicht¹¹⁾.

Herrn Prof. Dr. C. R. Hutchinson, University of Wisconsin, danken wir für eine Vorschrift zur Isolierung von Secologanin und eine Vergleichsprobe von Secologanintetraacetat. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektren (mit TMS als innerem Standard): Varian HA 100 bzw. Bruker WH 90. Massenspektrum: Varian MAT SM 1. IR-Spektren: Perkin-Elmer Spektrometer 421. UV-Spektren: Zeiss PMQ II.

Analytische (0.2 mm) und präparative (2.0 mm) Schichtchromatographie: Kieselgel P_F 254 (E. Merck). Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (70–230 mesh, E. Merck). Laufmittelsysteme: 1) Aceton/Benzol (5:2), 2) Chloroform/Methanol (3:1), 3) Äther.

Isolierung von Secologanin (1) aus Lonicera tatarica: 2500 g frischer Blätter und Triebe von *Lonicera tatarica* (Ernte im Juli) wurden in Methanol mit einem Braun MX 32 zerkleinert, durch ein Leinentuch filtriert und mit 2 mal 4 Liter Methanol bei 25°C und mit 1 mal 4 Liter Methanol bei 60°C für 2 h digeriert. Die vereinigten Filtrate neutralisierte man mit NaHCO₃, engte i. Vak. bei 40°C auf 500 ml ein und extrahierte mit 4 mal 150 ml Äther. Die organische Phase wurde mit 2 mal 100 ml Wasser gewaschen und die vereinigten wäßr. Phasen bei 40°C i. Vak. zu 280 g eines viskosen Öls eingedampft. Anschließend rührte man das Öl bei 20°C mit 4 mal 1 Liter Aceton für jeweils 6 h, filtrierte von ungelösten Verbindungen ab und dampfte i. Vak. ein. Man erhielt 60 g eines Schaums, der bereits zu 90% aus Secologanin (**1**) bestand. Zur weiteren Reinigung wurden 30 g des Rohproduktes an 1000 g Kieselgel (System 1) chromatographiert: 21.5 g (1.7%) farbloses Secologanin (**1**). Eine weitere Fraktion von 6.5 g (0.5%) enthielt grün gefärbtes, aber schichtchromatographisch ebenfalls einheitliches **1**.

⁹⁾ L. M. Jackman, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, S. 121, Pergamon Press, Inc., New York, N. Y. 1959.

¹⁰⁾ Vgl. L.-F. Tietze, Chem. Ber. **107**, 2491 (1974).

¹¹⁾ B. C. Mayo, Chem. Soc. Rev. **2**, 49 (1973).

¹H-NMR (D₂O/[D₆]Aceton): δ = 9.69 ppm (t, J = 2 Hz, CH), 7.51 (d, J = 2 Hz, CH), 5.9–5.2 (m, 2CH, CH₂), 4.66 (d, J = 7 Hz, CH), 3.66 (s, CH₃), 4.0–2.3 (m, 6CH, 2CH₂).

Zur eindeutigen Identifizierung wurde mit Acetanhydrid/Pyridin in das kristalline Tetraacetat übergeführt. Umkristallisation aus Äther ergab farblose Kristalle vom Schmp. 115–116°C (Lit. ⁴⁾ 115–116°C).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 9.70 ppm (t, J = 2 Hz, CH), 7.40 (d, J = 2 Hz, CH), 5.7–4.8 (m, 6CH, CH₂), 4.20 (ABX, CH₂), 3.8 (m, CH), 3.67 (s, CH₃), 3.3 (m, CH), 2.8 (m, CH), 2.3 (m, CH₂), 2.09 (s, CH₃), 2.02 (s, CH₃), 1.99 (s, CH₃), 1.90 (s, CH₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 199.63 ppm (d, J = 175 Hz, C-8), 169.85 (s, CO), 169.40 (s, CO), 168.69 (s, CO), 166.10 (s, C-11), 150.76 (d, J = 190 Hz, C-6), 131.98 (d, J = 155 Hz, C-9), 120.53 (t, J = 165 Hz, C-10), 109.26 (s, C-5), 95.54 (d, J = 170 Hz, C-2 und C-1'), 72.24 (d, J = 150 Hz, C-3' oder C-5'), 72.04 (d, J = 150 Hz, C-5' oder C-3'), 70.49 (d, J = 155 Hz, C-2'), 68.10 (d, J = 150 Hz, C-4'), 61.56 (t, J = 150 Hz, C-6'), 51.07 (q, J = 145 Hz, OCH₃), 43.63 und 43.17 (m, C-7 und C-3 oder C-4), 25.24 (d, J = 135 Hz, C-3 oder C-4), 20.45 und 20.06 (q, J = 125 Hz, 4CH₃).

Emulsin-Spaltung von Secologanin (1)

1. 300 mg (0.78 mmol) Secologanin (1) wurden 30 min bei 25°C in 10 ml sauerstofffreiem Citratpuffer (pH 5.2) mit 300 mg Emulsin (β -Glucosidase) unter N₂-Schutz gerührt. Anschließend extrahierte man mit 5 mal 10 ml Äther, wusch mit Wasser sowie konz. NaCl-Lösung und trocknete über Na₂SO₄. Nach Eindampfen erhielt man 75 mg eines gelben Öls, das durch schnelle Säulenchromatographie an Kieselgel (System 3, ASC; R_F = 0.64) gereinigt wurde. Ausb. 59 mg (33%) 7-Hydroxy-9-vinyl-2,8-dioxabicyclo[3,3,1]non-3-en-4-carbonsäure-methylester (11a).

IR: 3400 (OH), 1700 (C=O), 1625 cm⁻¹ (C=C). – UV (Methanol): λ_{\max} (lg ϵ) = 234 nm (3.94). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 7.68 ppm (s, 0.1 CH), 7.64 (s, 0.9 CH), 6.4–6.0 (m, CH), 5.4–5.2 (m, CH + CH₂), 5.10 (dd, J = 10 Hz, J = 4 Hz, CH), 5.1 (s, OH, austauschbar mit D₂O), 3.68 (s, CH₃), 2.8 (m, CH), 2.4 (m, CH), 2.0–1.7 (m, CH₂). – MS (70 eV): m/e = 226 (6%, M⁺), 208 (10%, M⁺ – H₂O), 180 (19%, 208 – CO oder C₂H₄), 176 (23%, 208 – CH₃OH), 125 (100%).

C₁₁H₁₄O₅ Ber. 226.0841 Gef. 226.0821

Darstellung des Acetats 11b: 68 mg (0.30 mmol) 11a wurden bei 20°C 10 h mit 1 ml Acetanhydrid und 1 ml Pyridin umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhielt man 65 mg (81%) eines farblosen Öls. ASC (System 3): Zwei Zonen. R_F = 0.84 (80%); R_F = 0.77 (20%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.26 ppm (s, 0.2 CH), 7.71 (s, 0.8 CH), 6.3–5.9 (m, 2CH), 5.5–5.0 (m, CH + CH₂), 3.72 (s, CH₃), 3.0 (m, CH), 2.4 (m, CH), 2.2–1.7 (m, CH₃ + CH₂).

Durch schnelle Säulenchromatographie an Kieselgel (System 3) konnte die obere Zone rein erhalten werden.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.71 ppm (s, CH), 6.2–5.9 (m, 2CH), 5.5–5.2 (m, CH + CH₂), 3.73 (s, CH₃), 3.0 (m, CH), 2.4 (m, CH), 2.08 (s, CH₃), 2.0–1.7 (m, CH₂). Doppelresonanz-Experimente: Einstrahlung δ = 1.9 ppm (6-H₂) → Signaländerung: δ = 6.2–5.9 ppm (7-H). Zugabe von [Eu(fod)₃]: Verschiebung der Signale δ = 7.71 ppm (3-H), 6.2–5.9 (7-H), 3.0 (5-H), 2.0–1.7 (6-H₂) um 1.0–0.6 ppm nach tieferem Feld. 7-H: δ = 6.68 ppm (dd, J = 9 Hz, J = 5 Hz).

2. 1.50 g (3.87 mmol) Secologanin (1) wurden 6 d bei 25°C in der oben beschriebenen Weise mit 150 mg Emulsin umgesetzt. Man erhielt nach Extraktion mit Äther 576 mg eines dunklen Rückstandes, der nach PSC an Kieselgel (System 3, R_F = 0.48) 247 mg (28%) 4 α -(1-Formyl-(E)-1-propenyl)-2 α,β -hydroxy-3,4-dihydro-2H-pyran-5-carbonsäure-methylester („Isosecologanin-aglycon“, 10a) als farbloses Öl lieferte. Die Emulsin-Spaltung verlief unter den angegebenen Bedingungen nicht vollständig.

IR (CHCl₃): 3400 (OH), 1705 (C=O), 1690 (CHO), 1620 cm⁻¹ (C=C). – UV (Methanol): λ_{\max} (lg ϵ) = 231 nm (4.08). – ¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 9.29 ppm (s, CH), 7.49 (d, J = 2 Hz,

CH), 6.70 (q, $J = 7$ Hz, CH), 5.46 (t, $J = 4$ Hz, CH), 5.7–5.3 (br. s, OH, austauschbar mit D_2O), 4.2–3.5 (m, CH), 3.56 (s, CH_3), 1.98 (d, $J = 7$ Hz, CH_3), 2.2–1.8 (m, CH_2). – MS (70 eV): $m/e = 226$ (37%, M^+), 208 (18%, $M^+ - H_2O$), 194 (37%, $M^+ - CH_3OH$), 164 (60%, 194 – CHO).

$C_{11}H_{14}O_5$ Ber. 226.0841 Gef. 226.0844

3. 150 mg (0.39 mmol) Secologanin (1) wurden in der oben beschriebenen Weise mit 50 mg Emulsin 3 und 10 h sowie 1, 3, 10 und 30 d umgesetzt. Außer 1, **10a** und **11a** konnten keine weiteren Verbindungen isoliert werden. Zusätzlich ließ sich noch eine schwache Zone (ca. 5%) bei $R_F = 0.60$ (System 3) nachweisen.

2 α , β -Acetoxy-4 α -(1-formyl-(*E*)-1-propenyl)-3,4-dihydro-2H-pyran-5-carbonsäure-methylester („Isosecologanin-aglyconacetat“, **10b**): 101 mg (0.45 mmol) **10a** wurden bei 0°C in 1 ml Acetanhydrid und 1 ml Pyridin gelöst und 12 h bei 20°C gerührt. Man dampfte i. Hochvak. ein, nahm den Rückstand in Chloroform auf und wusch mit 1 N HCl sowie konz. $NaHCO_3$ -Lösung. Eindampfen der organischen Phase i. Vak. lieferte 95 mg eines Öls, das durch PSC an Kieselgel (System 3) und anschließende Destillation im Kugelrohr gereinigt wurde. Sdp. 120°C (Ofentemp./ $5 \cdot 10^{-3}$ Torr), Ausb. 65 mg (54%).

IR ($CHCl_3$): 1750 (Acetat), 1705 (C=O), 1690 (CHO), 1635 cm^{-1} (C=C). – UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 230 nm (4.05). – 1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 9.34$ ppm (s, CH), 7.55 (d, $J = 2$ Hz, 0.3 CH), 7.49 (d, $J = 2$ Hz, 0.7 CH), 6.64 (q, $J = 7$ Hz, 0.7 CH), 6.60 (q, $J = 7$ Hz, 0.3 CH), 6.37 (t, $J = 3$ Hz, 0.7 CH), 6.25 (t, $J = 5$ Hz, 0.3 CH), 3.66 und 3.64 (2s, CH_3), 4.2–3.6 (m, CH), 2.2–2.0 (m, 2 CH_3 , CH_2). – MS (70 eV): $m/e = 268$ (10%, M^+), 237 (8%, $M^+ - CH_3O$), 225 (10%, $M^+ - COCH_3$), 208 (49%, $M^+ - CH_3CO_2H$), 180 (100%, 208 – CO).

$C_{13}H_{16}O_6$ Ber. 268.0947 Gef. 268.0954

[101/76]