

230. Zur Hydrolyse von C-Curarin49. Mitteilung über Calebassen-Alkaloide¹⁾von **M. Hesse, H. Schmid** und **P. Karrer**

(9. IX. 61)

Auf Grund von Analysen von C-Curarin und seinen Derivaten lässt sich kein sicherer Entscheid zwischen den für dieses Calebassen-Alkaloid möglichen Summenformeln $C_{40}H_{44}ON_4^{++}$ und der um 2 Wasserstoffatome reicheren Formel treffen.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass sich aus chemischen Umsetzungen und einer massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung von bisnor-C-Curarin für C-Curarin die wasserstoffärmere Bruttoformel ergibt¹⁾. Abbaureaktionen und Analyse von Kernresonanzspektren führten zur Aufstellung der aus zwei gleichen Hälften bestehenden Curarinformel I¹⁾.

Etwas früher haben WIELAND, REINSHAGEN & FRITZ²⁾ für C-Curarin die Formel II³⁾ vorgeschlagen, der die Summenformel $C_{40}H_{46}ON_4^{++}$ zugrunde liegt. Das Hauptargument für die Aufstellung dieser Formel war die Beobachtung, dass sich bei der Salzsäure-Hydrolyse von C-Curarin neben C-Fluorocurarin⁴⁾ (Ausbeute 5–10%)^{5) 6)} und anderen Stoffen in geringer Ausbeute Hemi-dihydrotoxiferin (= 18-Desoxy-WIELAND-GUMLICH-aldehyd-methosalz)⁷⁾ bilden soll, das laut Angaben der genannten Autoren durch seine Dimerisierung zu C-Dihydrotoxiferin einerseits und Dehydrierung zu C-Fluorocurarin andererseits identifiziert wurde. Alle diese Versuche wurden papierchromatographisch ausgeführt.

Es ist klar, dass bei Gültigkeit der Formel I Hemi-dihydrotoxiferin zumindest kein direktes Hydrolyseprodukt von C-Curarin darstellen kann. Aus diesem Grund haben wir die Versuche von WIELAND *et al.* nachgearbeitet, wobei wir uns hinsichtlich der Versuchsbedingungen möglichst weitgehend an die Angaben der deutschen Autoren hielten^{2) 5)}. Bei der Hydrolyse von 52 mg C-Curarin-dichlorid, das frei von C-Dihydrotoxiferin war, entstanden in unseren Versuchen wohl C-Fluorocurarin, Desformylfluorocurarin⁸⁾, Ultracurine⁹⁾ und andere noch nicht identifizierte Produkte, im durch

1) 48. Mitteilung: J. NAGYVARY, W. ARNOLD, W. v. PHILIPSBORN, H. SCHMID & P. KARRER, *Tetrahedron* **14**, 138 (1961).

2) TH. WIELAND, H. REINSHAGEN & H. FRITZ, *Naturwissenschaften* **48**, 50 (1961).

3) Dieser äquivalent wäre die Formel III.

4) W. v. PHILIPSBORN, H. MEYER, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **41**, 1257 (1958); H. FRITZ, E. BESCH & TH. WIELAND, *Liebigs Ann. Chem.* **617**, 166 (1958); W. v. PHILIPSBORN, K. BERNAUER, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **42**, 461 (1959); H. FRITZ, E. BESCH & TH. WIELAND, *Angew. Chem.* **71**, 126 (1959).

5) H. FRITZ & TH. WIELAND, *Liebigs Ann. chem.* **611**, 277 (1958).

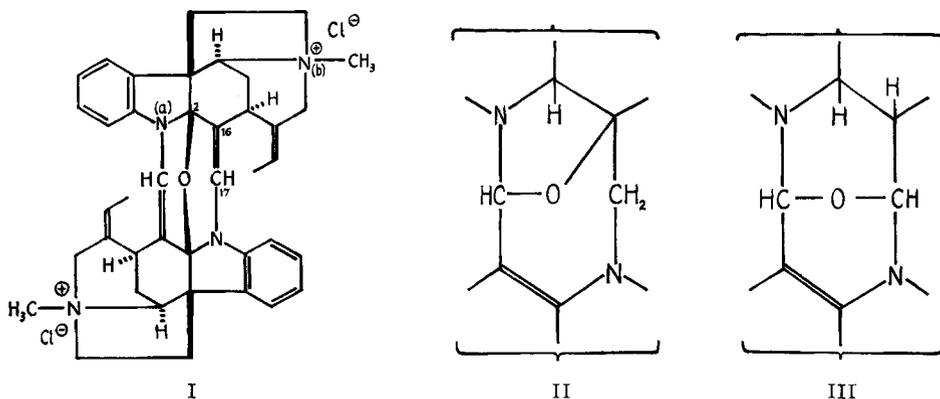
6) A. ZÜRCHER, O. CEDER & V. BOEKELHEIDE, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 1500 (1958).

7) K. BERNAUER, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **41**, 1408 (1958).

8) K. BERNAUER, W. ARNOLD, CH. WEISSMANN, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **43**, 717 (1960).

9) H. FRITZ & H. MEYER, *Liebigs Ann. Chem.* **617**, 162 (1958).

Acetatpuffer dimerisierten ¹⁰⁾¹¹⁾ Hydrolyseprodukt liess sich aber kein C-Dihydrotoxiferin nachweisen. In einem weiteren Versuch wurde aber gezeigt, dass bei der Säurespaltung einer Mischung von 30,6 mg C-Curarin-dichlorid und 1,5 mg C-Dihydrotoxiferin-dichlorid ein Hydrolysats entstand, das nach der Dimerisierung C-Dihydrotoxiferin gab. Die spektrophotometrisch ermittelte «Ausbeute» betrug allerdings nur 11,5% an C-Dihydrotoxiferin. Bei dem kleinen Ansatz stellt dieser Wert sicher eine Minimalgrösse dar. Schliesslich haben wir 0,10 mMol des früher hergestellten bisnor-Curarin-N_(b)-methyl-N_(b)-methyl-[¹⁴C]-dichlorids (C-Curarin-[¹⁴C]-dichlorid)¹²⁾ mit



Salzsäure hydrolysiert, das Hydrolysats dimerisiert, der Dimerisierungslösung 0,11 mMol C-Dihydrotoxiferin-dichlorid zugefügt und dann die Alkaloide als Pikrate gefällt¹³⁾. Nach Umwandlung in die Chloride hat man daraus C-Dihydrotoxiferin-dichlorid zurückisoliert und durch mehrfache Chromatographie an Papierbögen und durch öfteres Umkristallisieren gereinigt. Es zeigte nach dieser Behandlung $1,49 \times 10^{-3}$ % der molaren Aktivität des eingesetzten radioaktiven C-Curarin-[¹⁴C]-dichlorids.

Das für diese Versuche verwendete C-Curarin-[¹⁴C]-dichlorid wurde durch Einwirkung von Methyljodid-[¹⁴C] auf kristallisiertes bisnor-Curarin-monochlormethylat gewonnen¹²⁾. Es gab bei der Hydrolyse ein C-Fluorocurarin mit der *halben molaren* Aktivität des eingesetzten Alkaloides¹²⁾¹⁴⁾. Unter der Voraussetzung, dass die als Ausgangsmaterial dienende monoquartäre Verbindung einen einheitlichen Stoff darstellt, ist daraus folgendes zu schliessen: a) Die C-Curarin-Molekel ist aus zwei hinsichtlich des C-Gerüsts und des Oxydationszustandes gleichen Hälften aufgebaut, die beide bei der Hydrolyse C-Fluorocurarin liefern oder b) die C-Curarin-Molekel besteht aus zwei zum Beispiel hinsichtlich des Oxydationszustandes verschiedenen

¹⁰⁾ K. BERNAUER, F. BERLAGE, W. v. PHILIPSBORN, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **41**, 2293 (1958).

¹¹⁾ Hemi-dihydrotoxiferin lässt sich infolge seiner geringen Stabilität schlecht handhaben.

¹²⁾ W. v. PHILIPSBORN, W. ARNOLD, J. NAGYVARI, K. BERNAUER, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **43**, 141 (1960).

¹³⁾ Es wäre günstiger gewesen, das C-Dihydrotoxiferin-dichlorid am Anfang des Versuches zuzusetzen. Die zur Verfügung stehende Menge von C-Dihydrotoxiferin verbot aber dieses Vorgehen.

¹⁴⁾ Die säurekatalysierte Spaltung von C-Curarin-dichlorid braucht keinen Sauerstoff.

Hälften, die vor der Spaltung aber ein tautomeres Gleichgewicht eingehen, von dem aus jede Hälfte die Möglichkeit zur C-Fluorocurarin-Bildung hat²⁾).

Würde C-Fluorocurarin nur aus *einer* Hälfte einer aus verschiedenen Bruchteilen aufgebauten C-Curarin-Molekel stammen, dann hätte das oben erwähnte bisnor-Curarin-monochlormethylat ein 1:1-Gemisch der voneinander verschiedenen $N_{(b)}$ - und $N_{(b')}$ -Monochlormethylate darstellen müssen, was sehr wenig wahrscheinlich ist.

Auf jeden Fall hätte das eingesetzte radioaktive C-Curarin, wenn es die Formel II oder in Hinsicht auf den Oxydationszustand äquivalente Strukturen (z. B. III) besässe, neben dem radioaktiven C-Fluorocurarin radioaktives Hemi-dihydrotoxiferin derselben molaren Aktivität bzw. C-Dihydrotoxiferin der doppelten molaren Aktivität des C-Fluorocurarins liefern müssen. Bei Annahme einer 10-proz. Ausbeute an C-Dihydrotoxiferin hätte letzteres 4,5% der molaren Aktivität des eingesetzten C-Curarins besitzen müssen. Wie oben erwähnt, zeigt es jedoch nur $1,5 \times 10^{-3}$ % der molaren Aktivität, was einer Ausbeute an C-Dihydrotoxiferin von $3,2 \times 10^{-3}$ % entspräche, d. h. bei der Hydrolyse von C-Curarin wird *kein* Hemi-dihydrotoxiferin gebildet.

Damit fällt auch die von uns in Betracht gezogene Möglichkeit¹⁾, dass das Hemi-dihydrotoxiferin durch Reduktion von C-Fluorocurarin durch die bei der Hydrolyse zum Teil gebildete Ameisensäure hätte entstehen können, dahin.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und seiner KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT für die gewährte Unterstützung. Ferner danken wir Herrn Dr. F. KALBERER (SANDOZ A.G., Basel) für die Aktivitätsmessungen mit dem Scintillationszähler.

Experimenteller Teil

Alle Chemikalien waren MERCK *p. a.*-Präparate. Die Eindampfoperationen wurden im Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur zwischen 40–45° vorgenommen. Zur Papierchromatographie wurde als Laufmittel die obere Phase eines Gemisches aus 1800 ml Methyläthylketon, 90 ml 2-Methoxyäthanol und 420 ml Wasser²⁾ und als Papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b mgl. 58 \times 60⁵⁾ verwendet.

Das eingesetzte C-Curarin-dichlorid wurde wie folgt auf Abwesenheit von C-Dihydrotoxiferin-dichlorid geprüft: nebeneinander liess man Proben der Alkaloide unter Licht- und Sauerstoff-Ausschluss 24 Std. mit 1N Salzsäure stehen. Papierchromatographisch liess sich dann zeigen, dass C-Curarin unter diesen Bedingungen keine Veränderung erlitt, während das eingesetzte C-Dihydrotoxiferin-dichlorid vollständig in Hemi-dihydrotoxiferinchlorid und Harze umgewandelt war.

1. 52 mg C-Curarin-dichlorid wurden mit 15 ml konz. Salzsäure, wie von FRITZ & WIELAND⁵⁾ angegeben, 5 Std. auf 60° erhitzt und weiter aufgearbeitet. Das Hydrolysegemisch wurde an 2 Papierbogen (18 \times 58) chromatographiert, die sich dicht hinter dem C-Fluorocurarin befindlichen Substanzen, welche sich mit dem Ce^{IV} -sulfat-Reagens hellbraun bis rötlich anfärbten und die zum Teil Desformyl-fluorocurarin enthielten, eluiert und der Rückstand mit 1 ml einer Lösung aus 250,2 mg Eisessig, 371 mg Natriumacetat-3H₂O und 4 ml Wasser in einem kleinen Bombenröhrchen nach sorgfältigem Entgasen im Hochvakuum 6 Std. auf 69° (Hexanbad) erhitzt. Anschliessend wurde der Inhalt der Bombe in ein Zentrifugenglas transferiert, mit überschüssiger gesättigter Natriumpikratlösung versetzt, nach längerem Stehen bei 4° der Niederschlag abentrifugiert und mit wenig Eiswasser gewaschen. Anschliessend wurde das Pikrat wie üblich an der Austauschersäule in das Chlorid umgewandelt. Es enthielt, wie aus Farbreaktionen und Papierchromatogrammen hervorging, kein C-Dihydrotoxiferin.

2. 30,6 mg C-Curarin-dichlorid und 1,5 mg C-Dihydrotoxiferin-dichlorid in 7 ml konz. Salzsäure wurden wie unter 1. angegeben hydrolysiert. Das rohe Hydrolysenprodukt hat man, wie oben angegeben, direkt mit dem Acetatpuffer dimerisiert. Das Dimerisierungsprodukt wurde als

Pikrat isoliert, in das Chlorid umgewandelt und der erhaltene rötlich gefärbte Lack der Papierchromatographie unterworfen. Im Papierchromatogramm liess sich sehr leicht C-Dihydrotoxiferin durch seinen Rf-Wert und seine Farbreaktion nachweisen. Das aus dem Papier eluierte C-Dihydrotoxiferin-dichlorid wurde in 10 ml 95-proz. Äthanol gelöst. Die Lösung zeigte das für C-Dihydrotoxiferin-dichlorid typische UV.-Spektrum. Anhand der Extinktion bei 291μ ergab sich, dass diese Lösung 0,173 mg, d. h. 11,5% des eingesetzten C-Dihydrotoxiferin-dichlorides, enthielt. Diese Ausbeute entspricht sicher einem Minimalwert.

3. 74,9 mg C-Curarin-[^{14}C]-dichlorid¹⁵⁾ (0,104 mMol)¹⁵⁾, dessen Reinheit kontrolliert worden war, hat man mit 22 ml konz. Salzsäure hydrolysiert und das Hydrolysat dimerisiert. Nach der Dimerisierung wurden 75 mg inaktives C-Dihydrotoxiferin-dichlorid (0,110 mMol)¹⁶⁾ zugesetzt und aus der homogenen Lösung durch Zusatz von Natriumpikratlösung die Pikrate gefällt. Nach der üblichen Aufarbeitung hat man die aus den Pikraten bereiteten Chloride an drei Papierbogen chromatographiert. Die das C-Dihydrotoxiferin-dichlorid enthaltenden Zonen wurden ausgeschnitten und eluiert und das erhaltene Material (58,7 mg) zweimal aus Methanol-Aceton-Äther umkristallisiert (47,1 mg). Dieses C-Dihydrotoxiferin-dichlorid wurde nochmals chromatographiert und umkristallisiert (26,2 mg). Eine unendlich dicke Schicht dieses Präparates von $0,63 \text{ cm}^2$ zeigte unter dem Endfenster-GEIGER-Rohr $1,5 \pm 1,0$ ipm., während das eingesetzte C-Curarin-[^{14}C]-dichlorid nach 85,7-facher Verdünnung mit inaktivem C-Curarin-dichlorid 1052 ± 5 ipm. gab. Das C-Dihydrotoxiferin-dichlorid, das nach dieser Reinigung somit $1,57 \times 10^{-3}$ % der molaren Aktivität des eingesetzten C-Curarins-[^{14}C] zeigte, wurde noch ein drittes Mal chromatographiert und umgelöst (17,1 mg) und seine Aktivität wie diejenige des unverdünnten C-Curarin-[^{14}C]-dichlorids nach Umwandlung in CO_2 im Scintillationszähler bestimmt. Ersteres besass 10 dpm/mg, letzteres $6,324 \times 10^5$ dpm/mg, d. h. $1,49 \times 10^{-3}$ % der molaren Aktivität des verwendeten C-Curarins-[^{14}C]. Die Identität des verwendeten C-Dihydrotoxiferin-dichlorids wurde ausser durch Papierchromatogramme, Farbreaktionen usw. durch seine Überführung in C-Calebassin und C-Curarin nachgewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Gegensatz zu Angaben der Literatur wird bei der durch Salzsäure bewirkten Spaltung des Calebassen-Alkaloides C-Curarin, wie durch einen Isotopenverdünnungsversuch gezeigt wurde, kein Hemi-dihydrotoxiferin (18-Desoxy-WIELAND-GUMLICH-aldehyd-methosalz) gebildet.

Zürich, Organisch-chemisches Institut der Universität

¹⁵⁾ Unter Zugrundelegung eines auf Grund einer CH-Analyse ungefähr ermittelten Molgewichtes von 721,7 (Trihydrat).

¹⁶⁾ Unter Zugrundelegung eines Molgewichtes von 680,8: Helv. 36, 120 (1953).