

Isolierung von (R)-(-)-Armpavine aus *Rhamnus frangula* L.

Von

M. Pailer und E. Haslinger

Aus dem Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 14. Januar 1972)

Isolation of (R)-(-)-Armpavine from Rhamnus frangula L.

The isolation and identification of (R)-(-)-armpavine from fresh black alder tree bark is described. The base could no longer be identified in the drug after storage according to regulations.

Es wird die Isolierung und Identifizierung des (R)-(-)-Armpavins aus frischer Faulbaumrinde beschrieben. In vorschriftsmäßig gelagerter Droge konnte die Base nicht mehr nachgewiesen werden.

Rhamnus frangula L., auch Faulbaum oder Pulverholz genannt, ist ein in Europa, Nordafrika und Mittelasien beheimateter Baum oder Strauch aus der Familie der Rhamnaceae. Die abgelagerte Rinde findet schon seit langer Zeit als Laxans Verwendung. Bei Gebrauch der frischen, bedeutend wirksameren Faulbaumrinde kommt es häufig zu Übelkeit, Erbrechen und Koliken; deshalb darf nur längere Zeit gelagerte oder zuvor auf 100° erhitzte Droge verwendet werden¹.

Vor einiger Zeit wurden aus Faulbaumrinde die Peptidalkaloide Frangulanin² und Franganin³ isoliert. Ein drittes Alkaloid ähnlicher Struktur, das Frangufolin³, wurde aus den Blättern dieser Pflanze gewonnen. In dem Bestreben, die für die oben erwähnte Wirkung der frischen Rinde verantwortlichen Substanzen zu isolieren, untersuchten wir frisch gewonnenes Material und konnten aus der Basenfraktion durch mehrfache Säulenchromatographie neben Frangulanin einen anderen basischen Inhaltsstoff isolieren. Dieser ist nur in frisch geerntetem Material enthalten und wird beim Lagern abgebaut. Der Gehalt der Rinde an diesem Alkaloid hängt stark von der Jahreszeit ab und ist im Frühjahr am höchsten. Ob und wie weit diese Substanz für die erwähnten Nebenwirkungen der Droge verantwortlich ist, muß erst untersucht werden. Die Base konnte als Oxalat kristallisiert erhalten, durch Infrarot-, Ultraviolett-, Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie sowie durch chemischen Abbau und schließlich durch Vergleich

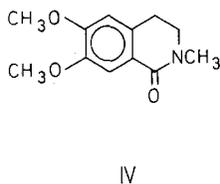
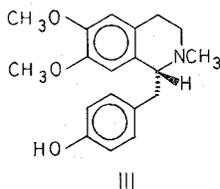
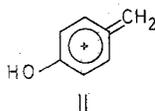
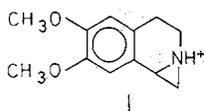
mit synthetischem Material* als (*R*)-(—)-Armepevin identifiziert werden.

Frisch gesammelte Faulbaumrinde wurde mit Ammoniak befeuchtet und mit Methylenchlorid mehrmals perkoliert. Die eingeeengten Perkolate wurden mit Citronensäurelösung ausgeschüttelt; das rohe Alkaloidgemisch wurde nach Alkalisieren mit Chloroform ausgezogen, durch Chromatographie an Aluminiumoxid entfärbt und durch Säulenchromatographie an Kieselgel weiter aufgetrennt. Nach dem Einengen der entsprechenden Fraktionen wurde das Alkaloid als Oxalat gefällt und durch mehrfaches Umkristallisieren aus Methanol gereinigt.

Die Summenformel des Oxalates ergab sich aus der Elementaranalyse zu $C_{19}H_{23}NO_3 \cdot C_2H_2O_4$. Das Infrarotspektrum des Alkaloids zeigte Absorptionen bei 3450 cm^{-1} (OH), im Aromatenbereich bei etwa 3000 cm^{-1} und eine N-CH₃-Bande bei 2790 cm^{-1} , jedoch keine Carbonylabsorption. Das Ultraviolettspektrum lieferte den Hinweis, daß der Chromophor ein Benzolring ohne zusätzliche Konjugation sein könnte. Im 60-MHz-Kernresonanzspektrum konnte man ein N-CH₃- sowie zwei O-CH₃-Signale erkennen. Zwischen $\delta = 2,5$ und $\delta = 4,0$ ppm trat eine nicht auflösbare Signalgruppe, die 7 Protonen entspricht, auf. Im Aromatenbereich zeigten sich zwischen $\delta = 6,0$ und $\delta = 7,0$ ppm Signale für 5 Protonen; eines davon, bei $\delta = 5,50$ ppm, konnte durch D₂O ausgetauscht werden und ist einer OH-Gruppe zuzuordnen, was durch Darstellung eines O-Acetylderivates bestätigt werden konnte. Erst im 100-MHz-Spektrum konnte eindeutig ein AA'BB'-System identifiziert und damit ein para-disubstituierter Benzolring als erstes Strukturelement erkannt werden. Alle anderen Aromatensignale waren nicht aufgespalten, so daß sowohl die ortho- als auch die meta-Stellung durch Substituenten besetzt sein mußte. Durch Lösen des Oxalates in D₂O war es möglich, aus der oben erwähnten Signalgruppe zwischen $\delta = 2,5$ und $\delta = 4,0$ ppm ein Dublett. Dublett bis auf $\delta = 4,50$ ppm zu verschieben. Dieses Signal entsprach einem Proton und es konnten durch INDOR-Technik Lage und Kopplungskonstanten der benachbarten H-Atome in dem nicht auflösbaren System bestimmt werden. Diese Information lieferte das Strukturelement $>CH-CH_2-$, wobei sich die CH-Gruppe zwischen O oder N und einem Benzolring befinden sollte. Die Protonen der CH₂-Gruppe erwiesen sich als magnetisch nicht äquivalent; es handelt sich dabei, wie sich später ergab, um die diastereotopen benzyllischen Protonen, die dem asymmetrischen C-Atom benachbart sind. Die Messung der chiroptischen Eigenschaften der Base ergab folgende Resultate: $[\alpha]_D^{20} = -111^\circ$, $\Delta \epsilon_{290} = -5,8$, $\Delta \epsilon_{234} = -21,1$. Einen wesentlichen Beitrag zur Klärung der Struktur

* Wir danken Herrn Prof. Dr. J. Knabe, Saarbrücken, für die Überlassung einer Vergleichsprobe.

lieferte die Massenspektrometrie. Das Molgewicht 313 stand im Einklang mit der vorher erhaltenen Summenformel. Der intensivste Peak lag bei $m/e = 206$. Durch Behandeln mit D_2O konnte erwartungsgemäß ein Wasserstoff ausgetauscht werden. Außerdem ließ sich damit zeigen, daß das Molekül in zwei Bruchstücke mit den Massen 206 und 107 gespalten wird, wobei der austauschbare Wasserstoff in dem kleineren Bruchstück lokalisiert ist. Fragmente der Masse 206 sind charakteristisch für Alkaloide vom Emetintyp⁴, und sie entstehen durch Abspaltung des Tetrahydroisochinolinsystems (I). Durch genaue Massenbestimmung konnte für dieses Bruchstück die Summenformel $C_{12}H_{16}NO_2$ bewiesen werden. Daraus



ergibt sich für das Fragment der Masse 107 C_7H_7O und unter Berücksichtigung der vorher erwähnten Ergebnisse die Struktur II.

Kombiniert man alle bisher erhaltenen Daten, bleibt für die Struktur des Alkaloids nur mehr die Möglichkeit III (wobei die Stereostruktur schon vorweggenommen ist), nämlich ein (*1R*)-(—)-1-(4-Hydroxybenzyl)-2-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin. Dieses Alkaloid ist unter der Bezeichnung (*R*)-(—)-Armepavin bekannt. Armepavin kommt in der Natur als Racemat, aber auch als (*R*)-(—)-Armepavin vor, (*S*)-(+)—Armepavin konnte durch Spaltung gewisser Bisbenzylisochinolinalkaloide erhalten werden. Aus folgenden Pflanzen wurde bisher Armepavin isoliert: *Nelumbo nucifera*⁵, *N. lutea*⁶, *Papaver caucasicum*⁷, *P. persicum*⁸, *P. armenicum*^{9, 10}, *P. trinefolium*⁹, *P. orientale*¹⁰, *P. floribundum*¹¹, *P. fugax*¹² und *Cryptocarya archiboldiana*¹³. Bedenkt man, daß Armepavin hauptsächlich in Pflanzen der Familie der Papaveraceae enthalten ist, so erscheint sein Vorkommen in *Rhamnus frangula* doch recht ungewöhnlich.

Die von uns erhaltenen physikalischen Daten der Base sowie die Schmelzpunkte des Oxalates und des Methojodides stimmen mit den bisher veröffentlichten Daten überein^{10, 14–21}. Außerdem konnten wir

durch Oxydation mit Kaliumpermanganat das auch für Armepavin beschriebene Abbauprodukt IV erhalten und charakterisieren²².

Durch Vergleich mit synthetischer Substanz konnte schließlich das Alkaloid eindeutig als (*R*)-(—)-Armepavin identifiziert werden^{17, 23}.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden, wenn nicht anders vermerkt, am Heizmikroskop nach *Kofler* bestimmt und sind unkorrigiert. Destillationen und Sublimationen wurden im Kugelrohr durchgeführt, die Temperaturangaben beziehen sich auf Luftbad. Die Infrarotspektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Spektrographen, Modell 237, die UV-Spektren mit einem Gerät der Fa. Cary, Modell 15, die 60 MHz Kernresonanzspektren mit einem Varian A 60 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Zur Messung des Circular-dichroismus diente ein Dichrograph der Fa. Roussell-Jouan; die 100-MHz-Kernresonanzspektren wurden mit einem Gerät der Fa. Varian (HA 100), die Massenspektren mit einem Varian MAT 111 Massenspektrometer aufgenommen.

Wir danken Herrn Dr. *G. Schulz* vom Sandoz-Forschungsinstitut Wien für die Aufnahme der 100-MHz-Kernresonanzspektren.

Isolierung und Trennung der Alkaloide

Die Faulbäume wurden 1971 in Oberösterreich gesammelt, möglichst rasch entrinde und die Rinde nach kurzem Trocknen an der Luft weiter verarbeitet. 15 kg Rinde, die mit NH_3 konz.: $\text{H}_2\text{O} = 1 : 1$ angefeuchtet waren, wurden in einem 50-l-Perkolator mit CH_2Cl_2 7mal (je 24 Stdn.) extrahiert. Aus den auf 1,5 l eingedampften Extrakten ließen sich durch 5maliges Ausschütteln mit 5proz. wäßr. Citronensäurelösung die Basen abtrennen. Die vereinigten wäßr. Ausschüttelungen wurden alkalisch gemacht und mehrmals mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die mit NaCl getrocknete CH_2Cl_2 -Lösung hinterließ nach Eindampfen 1 g gelblichbraune Rohbasen. Diese wurden in $\text{CHCl}_3 : \text{Äthanol} = 4 : 1$ gelöst und über eine etwa 20 cm lange Säule (\varnothing 1 cm), die mit basischem Aluminiumoxid (Akt. IV—V) gefüllt war, filtriert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels hinterblieben 0,8 g rosa gefärbtes Rohalkaloidgemisch. Anschließend wurde auf einer Stufensäule, die mit 100 g Kieselgel beschickt war, mit $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 95 : 5$ nach folgendem Schema chromatographiert:

Fraktion (je 20 ml)

- 1—12 leer
- 13—27 Frangulandin
- 28—34 roter Farbstoff
- 35—37 roter Farbstoff + Armepavin
- 38—46 Armepavin
- 47—75 sehr wenig Armepavin.

Die Fraktionen 38—46 wurden vereinigt, eingedampft und das zurückbleibende Alkaloid in wenig Methanol (p. a.) gelöst. Nach Zusatz von wenigen Tropfen einer gesätt. methanol. Oxalsäurelösung schied sich im Verlauf von einigen Minuten das Oxalat in langen, feinen Nadeln aus. Auf diese Weise

konnten 280 mg Oxalat erhalten werden; das entspricht etwa einem Alkaloidgehalt von 10⁻³%. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol konnte das Oxalat rein, Schmp. 206—208 °C²¹, erhalten werden. Der Mischschmelzpunkt mit authentischem (*R*)-(—)-Arnepavinoxalat zeigte keine Depression.

$C_{21}H_{25}NO_7$. Ber. C 62,52, H 6,25, N 3,47, O 27,76.
Gef. C 62,42, H 6,14, N 3,55, O 27,89.

Aus dem Oxalat konnte das Alkaloid durch Chromatographie an basischem Aluminiumoxid (Akt. IV—V) mit $CHCl_3 : CH_3OH = 9 : 1$ erhalten werden.

Spektroskopische Untersuchungen

Das Infrarotspektrum des freien Alkaloids (in CCl_4) zeigt neben einer intensiven Bande bei 1520 cm^{-1} Absorptionen bei 1615 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} . Eine Bande bei 3450 cm^{-1} beweist die Anwesenheit einer OH-Gruppe. Ein in KBr aufgenommenes Infrarotspektrum zeigt im wesentlichen die gleichen Banden und ist mit dem Spektrum von authent. Material praktisch deckungsgleich.

Das Infrarotspektrum des Alkaloidoxalates zeigt Absorption bei 3220 cm^{-1} , 3050 cm^{-1} , 2940 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 1608 cm^{-1} , 1537 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} , 1435 cm^{-1} , 1265 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} , 1005 cm^{-1} , 853 cm^{-1} , 833 cm^{-1} , 705 cm^{-1} und ist mit einem Spektrum von (*R*)-(—)-Arnepavinoxalat völlig deckungsgleich.

Das UV-Spektrum der Base zeigt (in Äthanol) Maxima bei $\lambda = 227$ nm und bei $\lambda = 283$ nm, die mit den bisher veröffentlichten Werten übereinstimmen²⁴. Das Spektrum des Oxalates ergibt folgende Werte: $\lambda_{max} = 227$ nm ($\epsilon = 12\ 800$) und $\lambda_{max} = 280$ nm ($\epsilon = 4\ 150$).

Das NMR-Spektrum des Alkaloids (in $CDCl_3$) zeigt neben einer nicht auflösbaren, 7 Protonen entsprechenden Signalgruppe zwischen $\delta = 2,5$ ppm und $\delta = 4,0$ ppm Signale bei $\delta = 2,56$ ppm (NCH_3), $\delta = 3,54$ ppm (OCH_3 , Pos. 7), $\delta = 3,83$ ppm (OCH_3 , Pos. 6), $\delta = 5,98$ ppm (H, Pos. 8), $\delta = 6,57$ ppm (H, Pos. 5) und ein $AA'BB'$ -System, von dem nur 4 Signale (bei $\delta = 6,62$, 6,70, 6,88 und 6,96 ppm) auftreten. Der große Unterschied in der chemischen Verschiebung bei den Signalen der aromatischen H in Position 5 und 8 sowie bei den OCH_3 -Signalen in Positionen 6 und 7 kann durch den Abschirmeffekt der Benzylgruppe erklärt werden¹⁵.

Das NMR-Spektrum des Oxalates wurde in D_2O bei 70 °C aufgenommen; das Signal des Protons an C-1 tritt dann bei 4,50 ppm auf und kann für ein INDOR-Experiment genutzt werden. Die so erhaltenen Kopplungskonstan-

ten für das System $CH_a-C \begin{array}{l} \swarrow H_b \\ \searrow H_c \end{array}$ hatten folgende Werte: $J_{ab} = 5$ Hz,

$J_{ac} = 8$ Hz, $J_{bc} = 13$ Hz.

Die Bestimmung der optischen Drehung in $CHCl_3$ ($c = 0,925$) ergab $[\alpha]_D^{20} = -111$ ^{16, 17, 20, 21}.

Circulardichroismus: $\Delta \epsilon_{290} = -5,8$, $\Delta \epsilon_{234} = -21,1$ ($c = 0,00133$, Äthanol). Lage und Vorzeichen der Effekte stimmen mit den bekannten ORD-Kurven für (*R*)-(—)-Arnepavin überein¹⁶.

Das Massenspektrum ergab 313 als Molgewicht. Der Base peak liegt bei $m/e = 206$, weitere intensive Peaks findet man bei $m/e = 296, 191, 162, 145$,

132, 107, 106 und 77. Beim Austausch mit Deuterium treten zusätzlich die Massenwerte 314, 297, 108 und 78 auf.

Darstellung des Methojodides

5 mg Alkaloid wurden in 1 ml Methanol gelöst, mit 0,5 ml Methyljodid versetzt und am Wasserbad erwärmt. Schon nach kurzer Zeit schied sich das Methojodid in weißen Kristallen, Schmp. 199—201 °C, ab (Lit. 199 bis 200 °C)^{10, 13}. Der Mischschmelzpunkt mit (*R*)-Artepavinmethojodid, im Schmelzröhrchen bestimmt, zeigte keine Depression.

Oxydation mit KMnO₄

10 mg Alkaloid wurden in 5 ml Aceton (p. a.) gelöst und mit KMnO₄ in üblicher Weise oxydiert. Nach beendeter Reaktion filtrierte man vom MnO₂ ab und führte die Lösung in ein Kugelrohr über. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand bei 150 °C (10⁻³ Torr) destilliert. Das so erhaltene Produkt IV hatte Schmp. 124—125 °C (Lit.-Schmp. 125 °C)²¹ und zeigte im Massenspektrum das erwartete Molgewicht von 221.

Darstellung des Acetylderivates

20 mg Alkaloid wurden in 2 ml absol. Äthanol gelöst, mit einigen Tropfen frisch destill. Ac₂O versetzt und zwei Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Anschließend wurde nach kurzem Erwärmen im Vak. eingengt, mit Wasser verdünnt, mit NaOH versetzt und mit Äther extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels konnte das Alkaloidacetat durch präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel PF₂₅₄ mit CHCl₃:CH₃OH = 9:1 gereinigt werden. Das Acetat hat einen *R_f*-Wert von etwa 0,52, während das nicht umgesetzte Alkaloid einen *R_f*-Wert von etwa 0,35 hat. Nach Eluieren des Acetats vom Kieselgel mit CH₃OH und Verdampfen des Lösungsmittels konnte das Alkaloidacetat rein erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte durch IR-, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Im Infrarotspektrum trat zusätzlich bei 1740 cm⁻¹ die Estercarbonylbande auf, im NMR-Spektrum konnte man bei $\delta = 2,30$ ppm ein Singulett (COCH₃), das 3 Protonen entsprach, finden, und das Molgewicht (Massenspektrum) lag bei 355.

Literatur

- ¹ O. Geßner, Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa. Heidelberg: Karl Winter Universitätsbuchhandlung. 1931.
- ² R. Tschesche, H. Last und H. W. Fehlhaber, Chem. Ber. **100**, 3937 (1967).
- ³ R. Tschesche und H. Last, Tetrahedron Letters **25**, 2993 (1968).
- ⁴ G. Spiteller, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, S. 287. Weinheim: Verlag Chemie. 1966.
- ⁵ M. Tomita, Y. Watanabe und H. Furukawa, Yakugaku Zasshi **81**, 1644 (1961); M. Kupchan, B. Dasgupta, E. Fujita und M. L. King, J. Pharm. Sci. **51**, 599 (1962); J. Kunitomo, Ch. Yamamoto und T. Otsuki, Yakugaku Zasshi **84** (11), 1141 (1964).
- ⁶ S. M. Kupchan, B. Dasgupta, E. Fujita und M. L. King, Tetrahedron **19**, 227 (1963).

- ⁷ S. Pfeifer und L. Kuehn, Pharmazie **23** (5), 267 (1968); L. Kuehn, S. Pfeifer, J. Slavik und J. Appelt, Naturwissenschaften **51** (23), 556 (1964).
- ⁸ S. Pfeifer und L. Kuehn, Pharmazie **22** (4), 221 (1967).
- ⁹ J. Slavik und J. Appelt, Collection Czech. Chem. Commun. **30** (11), 3687 (1965).
- ¹⁰ R. Konovalova, S. Yunussov und A. Orekhov, Ber. **68 B**, 2158 (1935).
- ¹¹ R. Konovalova, S. Yunussov und A. Orekhov, Ber. **68 B**, 2277 (1935).
- ¹² S. Y. Yunussov, V. A. Mnatsakanyan und S. T. Akramov, Dokl. Akad. Nauk Uzb. SSR 1961, Nr. 843.
- ¹³ S. R. Johns, J. A. Lambertson und H. J. Tweeddale, Austral. J. Chem. **22** (6), 1313 (1969).
- ¹⁴ L. Hruban und F. Santavy, Coll. Czech. Chem. Commun. **32** (9), 3414 (1967).
- ¹⁵ G. Freankel, M. P. Cava und D. R. Dalton, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 329 (1967).
- ¹⁶ J. C. Craig und S. K. Roy, Tetrahedron **21**, 401 (1965).
- ¹⁷ J. Knabe und P. Horn, Archiv d. Pharmazie **300**, 547 (1967).
- ¹⁸ Tsang-Hsiung Yang und Sheng-Teh Lu, Yakugaku Zasshi **83**, 22 (1963).
- ¹⁹ M. Tomita und H. Furukawa, Yakugaku Zasshi **82**, 1458 (1962).
- ²⁰ V. Preininger, J. Appelt, L. Slavikova und J. Slavik, Collect. Czech. Chem. Commun. **32** (7), 2682 (1967).
- ²¹ S. Yunusov, R. A. Konovalova und A. P. Orekhov, J. Gen. Chem. (USSR) **10**, 641 (1940).
- ²² C. Ferrari und V. Deulojeu, Tetrahedron **18**, 419 (1962).
- ²³ V. Preininger, A. D. Cross und F. Šantavý, Coll. Czech. Chem. Comm. **31**, 3345 (1966).
- ²⁴ M. Tomita, T. Sasaki und S. Matsumura, Yakugaku Zasshi **79**, 1120 (1959).