

Die Strukturermittlung von Gelsemium-Alkaloid C (14-Hydroxygelsemicin) durch NMR- und Massenspektrometrie

2. Mitt. über Gelsemium-Alkaloide¹

Von

M. Wichtl, A. Nikiforov, G. Schulz, Susanne Sponer und K. Jentzsch

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Wien,
dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien
und dem Forschungszentrum Sandoz, Wien, Österreich

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1972)

Structure Elucidation of Gelsemium-Alkaloid C (14-Hydroxy- gelsemicin) by NMR- and Mass-spectrometry

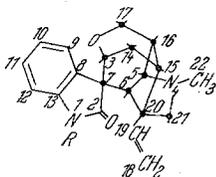
The structure of a further minor alkaloid of *Gelsemium sempervirens* (L.) Ait., preliminary designated as Gelsemium alkaloid C, could be elucidated as 14-hydroxygelsemicin. NMR- and mass-spectrometry was most useful for this purpose, beside chemical reactions; the spectra are discussed in detail.

Die Struktur eines weiteren Nebenalkaloides aus *Gelsemium sempervirens* (L.) Ait., vorläufig als Gelsemium-Alkaloid C bezeichnet, konnte als 14-Hydroxygelsemicin erkannt werden, wobei sich neben chemischen Befunden vor allem die Ergebnisse der NMR- und Massenspektrometrie als wertvoll erwiesen; die Spektren werden näher besprochen.

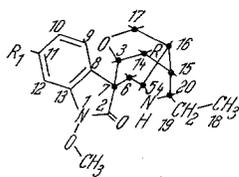
Aus einem Extrakt der Wurzeldroge von *Gelsemium sempervirens* haben wir neben den bereits bekannten Alkaloiden Gelsemin^{2, 3} (I), Gelsemicin⁴ (II) und Gelsedin⁵ (III) noch zwei weitere, als Gelsemium-Alkaloid A (IV) bzw. C (V) bezeichnete Alkaloide in größeren Mengen isoliert.

Gelsemium-Alkaloid A konnte auf Grund seines charakteristischen Fragmentierungsverhaltens und durch chemische Befunde als N-1-Methoxygelsemin identifiziert werden¹.

Im folgenden wird über die Ergebnisse der Strukturermittlung des Gelsemium-Alkaloids C berichtet; die pharmakologischen Eigenschaften der beiden neuen Nebenalkaloide aus *Gelsemium sempervirens* werden in einem anderen Zusammenhang besprochen werden.



R = H: Gelsemin (I)
 R = OCH₃: Gelsemium-
 Alkaloid A =
 N-1-Methoxy-
 gelsemin (IV)



R, R₁ = H: Gelsedin (III)
 R = H, R₁ = OCH₃: Gelsemicin (II)
 R = OH, R₁ = OCH₃: Gelsemium-
 Alkaloid C =
 14-Hydroxy-
 gelsemicin (V)

Ein Vergleich der *CD*-Kurve des Gelsemium-Alkaloids C (V) mit den *CD*-Kurven von Gelsemin (I) und N-1-Methoxygelsemin [= Gelsemium-Alkaloid A (IV)] einerseits und Gelsedin und Gelsemicin andererseits läßt klar erkennen, daß das Alkaloid C zur Gelsedin-Reihe gehört (s. Abb. 1). Diese Zuordnung wird auch durch die außerordentliche Toxizität des Alkaloids C bestätigt: Derivate des Gelsemins sind wesentlich weniger toxisch als Gelsedin-Derivate.

Aus dem Massenspektrum ergibt sich für V das Molekulargewicht 374, die Bruchstücke im oberen Massenbereich lassen auf die Anwesenheit von mindestens einer Methoxygruppe im Molekül schließen. Das Ion *m/e* 168 besitzt die höchste Intensität (Abb. 2). In den Massenspektren von Alkaloiden der Gelsedin-Reihe¹ beobachtet man das Auftreten eines Schlüsselbruchstückes bei *m/e* 152. Die Verschiebung des Schlüsselbruchstückes um 16 Masseneinheiten zur Masse 168 im Massenspektrum des Alkaloids V kann durch die Anwesenheit eines weiteren Sauerstoffs im oxindolfreien Teil erklärt werden. Damit im Einklang ist auch das im Vergleich zu Gelsemicin (*MG* = 358) um 16 Masseneinheiten höhere Molekulargewicht. Daß das Ion 168 zwei Sauerstoffatome enthält, wurde durch Hochoauflösung bestätigt (Exakte Masse = 168,103 = C₉H₁₄NO₂). Durch Deuteriumoxidaustausch konnte gezeigt werden, daß V zwei aktive Wasserstoffatome besitzt.

Mit dem Eintritt der beiden Deuteriumatome in das Ion 168 (Verschiebung zur Masse 169 und 170) wird die Anwesenheit der beiden aktiven Wasserstoffatome im oxindolfreien Teil des Alkaloids C sehr wahrscheinlich. Das in den Massenspektren von Gelsedin und Gelsemicin auftretende Schlüsselbruchstück *m/e* 84 wird durch Deuteriumoxid-austausch um eine Masseneinheit verschoben. Dadurch wird einerseits die Anwesenheit der freien Aminogruppe bestätigt und andererseits die Stellung der OH-Gruppe auf den Pyranring beschränkt, da sonst eine weitere Verschiebung dieses Bruchstückes hätte eintreten müssen.

Die Acetylierung des Alkaloids C mit Essigsäureanhydrid in Pyridin lieferte ein Diacetylderivat mit dem Molekulargewicht 458 und der erwarteten Verschiebung des Schlüsselbruchstückes 168 zu den Massen 210 bzw. 252. Die Oxydation des Alkaloids C mit Kaliumdichromat in Eis-

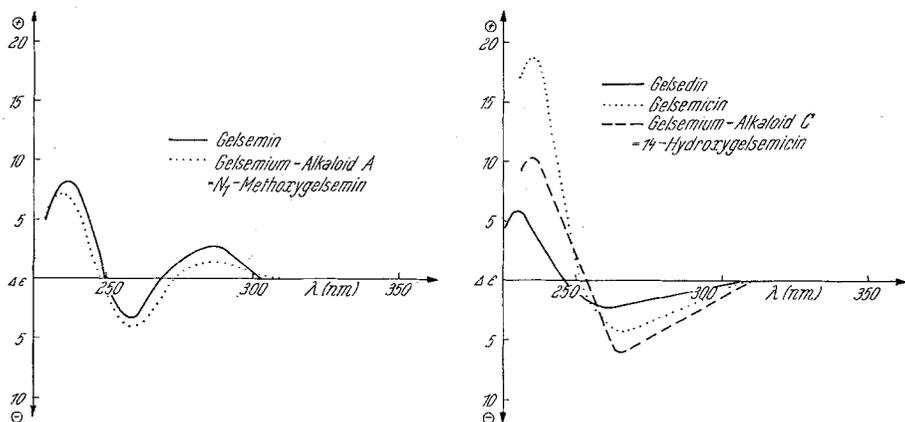


Abb. 1. CD-Kurven von Gelsemium-Alkaloiden

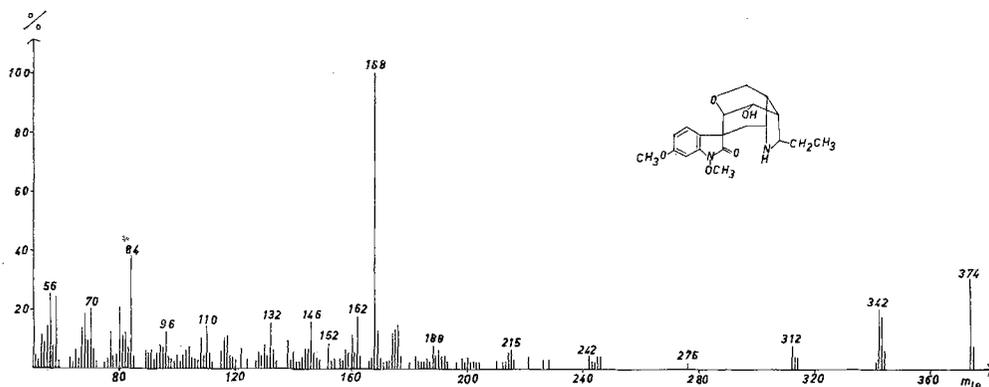


Abb. 2. Gelsemium-Alkaloid C (14-Hydroxygelsemin)

essig ergab eine Verbindung mit dem Molekulargewicht 372 und einem Schlüsselbruchstück m/e 167. Aus diesen beiden chemischen Befunden kann auf die Anwesenheit einer sekundären OH-Gruppe im Alkaloid C geschlossen werden, die sich an C-14 oder an C-17 befindet; die Stellung an C-17 ist dabei wegen der Hemiacetalgruppierung weniger wahrscheinlich. Die genaue Stellung der OH-Gruppe folgt schließlich aus einem Vergleich des NMR-Spektrums von Alkaloid C mit dem NMR-Spektrum des Gelsemicins.

Im NMR-Spektrum des Gelsemicins treten im Bereich 3,2 bis 4,5 ppm außer den Signalen der beiden Methoxyl-Gruppen die Signale von 4 Protonen auf (s. auch Tab. 1):

1. Der *AB*-Teil eines *ABX*-Systems mit Schwerpunkt bei 4,28 ppm. Dieses Signal muß der CH_2 -Gruppe neben dem Sauerstoff (C-17) zugeordnet werden.

Tabelle 1. NMR-Spektren von Hydroxygelsemicin (Gelsemium-Alkaloid C) und Gelsemicin

Zuordnung	Hydroxygelsemicin		Gelsemicin
	Lage	Aufspaltung†	Lage
N-OCH ₃	3,97	S	3,98
<i>Ar</i> -OCH ₃	3,80	S	3,81
H an C-9	7,28	D 8 Hz	7,38
C-10	6,63	DD 8 und 2 Hz	6,63
C-12	6,53	D 2 Hz	6,55
C-6	1,95	} <i>AB</i> -Teil eines <i>ABX</i> -Systems $J_{AB} = 16$ Hz, $J_{AX} = 3,5$, $J_{BX} = 3$ Hz	20—22*
C-5	2,11		DT 9 und 3 Hz
C-20	2,95	TD 7 und 3,5 Hz	~ 2,90*
C-3	3,38	Halbwertsbreite 3 Hz	3,48
C-14	4,38	S	2,8—3,0*
C-15	2,0*		~ 2,0*
C-16	2,45	DT 9 und 4 Hz ††	2,50
C-17	4,27	} <i>AB</i> -Teil eines <i>ABX</i> -Systems $J_{AB} = 11$ Hz, $J_{AX} = 4$, $J_{BX} < 2$ Hz	4,22
	4,41		4,34
Äthyl-CH ₂	1,87	Quintett 7 Hz	~ 1,80
Äthyl-CH ₃	1,07	Triplet 7,2 Hz	1,00

Die Spektren wurden in CDCl_3 -Lösung mit *TMS* als innerem Standard aufgenommen. D = Dublett, T = Triplet.

* Durch Überlagerung verdeckt.

† Wenn nichts anderes angegeben, zeigt sich im NMR-Spektrum des Gelsemicins die gleiche Aufspaltung.

†† Aufspaltung beim Gelsemicin: D 6 Hz.

2. Ein doppeltes Triplet bei 3,66 ppm mit Aufspaltungen von 9 Hz und zweimal 3 Hz.

3. Ein Dublett bei 3,48 ppm mit einer Aufspaltung von 6 Hz. Eines dieser beiden letzteren Signale muß vom H-Atom an C-3 stammen, das andere Signal könnte von einem H-Atom herrühren, das sich in α -Stellung zum N-Atom befindet.

Im Spektrum des Gelsemium-Alkaloids C tritt der *AB*-Teil des *ABX*-Systems (s. Tab. 1) bei 4,34 ppm auf, das doppelte Triplet ist

erhalten geblieben (3,56 ppm), aus dem Dublett ist jedoch ein verbreitertes Singulett geworden (3,38 ppm, Halbwertsbreite 3 Hz). Durch Doppelresonanz konnte gezeigt werden, daß das Signal bei 3,56 ppm nicht von dem H an C-3 stammt. Die 9 Hz-Aufspaltung kommt durch Kopplung mit einem benachbarten H-Atom zustande, dessen Signal bei 2,45 ppm als Quintett auftritt (entstanden durch eine Aufspaltung von 9 Hz und 2 Aufspaltungen von etwa 4 Hz). Dieses Signal kann nicht von dem Proton einer CH₂-Gruppe stammen, da es keine Aufspaltung enthält, die von einer geminalen Kopplung herrühren könnte. Die eine Aufspaltung von 4 Hz kommt durch Kopplung mit dem Signal bei 4,41 ppm, das dem einen H-Atom an C-17 zugeordnet werden muß, zustande. Demzufolge muß das Signal bei 2,45 ppm von dem H-Atom an C-16 stammen. Die zweite Aufspaltung von etwa 4 Hz kommt sehr wahrscheinlich durch Kopplung mit dem H-Atom an C-15 zustande. Das Signal bei 3,56 ppm muß dann von dem H-Atom an C-5 stammen, das mit den beiden H-Atomen an C-6 gekoppelt ist, und zwar jeweils mit etwa 3 Hz.

Damit ist aber zugleich bewiesen, daß das Signal bei 3,48 ppm im Spektrum des Gelsemicins [und bei 3,38 ppm im Spektrum des Gelsemium-Alkaloids C (Hydroxygelsemicin)] vom H-Atom an C-3 stammt. Daraus, daß beim Übergang vom Gelsemicin zum Hydroxygelsemicin die 6 Hz-Aufspaltung verlorengeht, kann geschlossen werden, daß die zusätzliche OH-Gruppe sich an C-14 befindet, und zwar in der quasi-äquatorialen Anordnung (Modellbetrachtung). Daß keine Kopplung zwischen dem an C-14 verbleibenden H-Atom, dessen Signal bei 4,38 ppm auftritt, und dem H-Atom an C-3 beobachtet wird, kann dadurch erklärt werden, daß diese beiden H-Atome einen Torsionswinkel von etwa 90° einschließen.

Das Signal des H-Atoms an C-20 liegt bei 2,95 ppm (gekoppelt mit der CH₂-Gruppe des Äthylrestes), die Existenz des H-Atoms an C-15 folgt aus der Aufspaltung des Signals. Die beiden H-Atome an C-6 liefern den AB-Teil eines ABX-Systems mit Schwerpunkt bei 2,4 ppm. Auch daraus kann geschlossen werden, daß — sofern das Gerüst des Gelsemicins erhalten geblieben ist — die zusätzliche OH-Gruppe sich an C-14 befinden muß, da sämtliche anderen H-Atome erhalten geblieben sind.

Die Übereinstimmung im Oxindolteil der beiden Alkaloide ergibt sich aus der Übereinstimmung der Signale der aromatischen Protonen.

Auf Grund der erwähnten Befunde kommt dem Gelsemium-Alkaloid C die Struktur eines 14-Hydroxygelsemicins zu.

Für die Aufnahme des Circular dichroismus danken wir Frl. U. Wagner, für die Aufnahme des hochaufgelösten Massenspektrums Herrn Dr.

Dipl.-Ing. K. Varmuza. Für das stets fördernde Interesse möchten wir Herrn Prof. Dr. U. Schmidt auch an dieser Stelle verbindlichen Dank sagen.

Experimenteller Teil

Die *CD*-Kurven wurden mit einem Roussel-Jouan Dichrographen Modell B aufgenommen. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte bei einer Elektronenenergie von 70 eV und einer Temperatur im Direkteinlaßsystem von etwa 100° mit den Geräten CH-7 bzw. SM-1 der Firma Varian. Die NMR-Spektren und die Doppelresonanzspektren wurden mit einem HA-100 D-Gerät der Firma Varian registriert.

Reindarstellung von V

Die Herstellung des alkaloidhaltigen Extraktes und die Trennung durch Säulenchromatographie wurde bereits ausführlich beschrieben¹. Für die Reindarstellung von V verwendeten wir 280 mg der säulenchromatographisch gewonnenen Fraktionen 127—151. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aceton fielen 45 mg kristallines Alkaloid V — in Form durchscheinender prismatischer Blättchen — an, die bei papier- sowie dünnschichtchromatographischer Kontrolle einheitlich erschienen. Vor Aufnahme der *CD*-Kurven, NMR- und Massenspektren wurde die Substanz noch durch Sublimation im Hochvak. bei etwa 250 °C gereinigt.

Acetylierung des Alkaloids C (V)

2 mg von V wurden in 0,5 ml Pyridin gelöst und nach Zugabe von 0,5 ml Ac_2O 2 Stdn. auf 100° erhitzt. Der Abdampfrückstand lieferte ein Massenspektrum mit Molekulargewicht 458.

Oxydation von V

2 mg von V wurden in 0,5 ml Eisessig gelöst und mit 0,25 ml einer gesätt. Lösung von $K_2Cr_2O_7$ in H_2O versetzt; anschließend wurde 4 Stdn. auf 100° erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit K_2CO_3 neutralisiert und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Der Abdampfrückstand lieferte ein Massenspektrum mit Molekulargewicht 372 und einem Schlüsselbruchstück 167.

Literatur

- ¹ 1. Mitt.: M. Wiehtl, A. Nikiforov, Susanne Sponer und K. Jentsch, Mh. Chem. **104**, 87 (1973).
- ² H. Conroy und J. K. Chakrabarti, Tetrahedron Letters **1959**/4/6.
- ³ F. M. Lovell, R. Pepinsky und A. J. C. Wilson, Tetrahedron Letters **1959**/4/1.
- ⁴ M. Przybylska und L. Marion, Canad. J. Chem. **39**, 2124 (1961).
- ⁵ E. Wenkert, J. C. Orr, S. Garratt, J. H. Hansen, B. Wickberg und C. L. Leicht, J. org. Chem. **27**, 4123 (1962).