

Über die Konfiguration des Prolins im Ergotamin*

Von

Maximilian Pöhm, Harald Kolassa und Kurt Jentzsch

Pharmakognostisches Institut, Universität Wien, Österreich

(Eingegangen am 8. September 1976)

Configuration of Proline in Ergotamine

It is well known that in the ergot alkaloids of the peptide type the proline appears in the L-configuration. Different methods of acid hydrolysis may lead to various cleavage products; hydrolysis by HCl yields D-proline, on the other hand hydrolytic cleavage by means of strongly acid cation exchange resin preserved the original L-configuration.

Durch die Totalsynthese des Ergotamins¹ erscheint die Stereochemie sowohl der Lysergsäure wie auch des Peptidteiles endgültig geklärt; insbesondere steht auch fest, daß Prolin im Ergotamin und in den übrigen Peptidalkaloiden des Mutterkorns in L-Konfiguration vorliegen muß. Dennoch war die Stereochemie dieser Aminosäure in den Secale-Alkaloiden immer wieder umstritten, da die verschiedenen Spaltungsmethoden stereochemisch unterschiedliche Produkte ergaben (vgl. Lit.²): Es wurden sowohl D-Prolin und D,L-Prolin³ als auch L-Prolin^{4, 5} isoliert.

Bemerkenswert ist vor allem, daß bei der sauren Hydrolyse mit konz. Salzsäure³ D-Prolin erhalten wurde, welches als Methylester isoliert wurde.

Da mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie die Möglichkeit besteht, Aminosäuren ohne Derivatisierung zu isolieren, erschien uns die Nachprüfung dieses Ergebnisses sinnvoll, zumal das Auftreten von D-Prolin als Spaltungsprodukt auf Grund der Konstitutionsformel des Ergotamins kaum befriedigend erklärt werden kann. Ebenfalls untersuchten wir die Hydrolyse des Ergotamins mittels eines stark sauren Kationenaustauschers; diese Methode ist seinerzeit von uns als schonende und wirksame Art der Hydrolyse beschrieben worden⁶.

* Teilveröffentlichung der Dissertation von H. Kolassa, Univ. Wien, 1973.

Sowohl aus dem mit Salzsäure, als auch aus dem mit Kationenaustauscher gewonnenen Hydrolysat haben wir die Aminosäure Prolin unter Anwendung der Ionenaustausch-Chromatographie von den übrigen Spaltungsprodukten abgetrennt.

Aus dem optischen Drehvermögen der Prolin-Lösungen konnte ermittelt werden, daß nach *salzsaurer* Hydrolyse Prolin zu 80% in der D-Form vorliegt, wodurch im wesentlichen die Ergebnisse von *Jacobs* und *Craig* aus dem Jahre 1935³ bestätigt wurden. Unser Verfahren der schonenden Hydrolyse mit *Kationenaustauscher* bewirkte die Peptidspaltung unter weitgehender Erhaltung der im natürlichen Ergotamin vorliegenden sterischen Anordnung: Die gereinigte Prolin-Lösung enthielt 90% L- und 10% D-Prolin. Bei der Hydrolyse mit Kationenaustauscher ist also die L-Konfiguration des Prolins praktisch erhalten geblieben.

Die verschiedenen Ergebnisse dieser beiden Varianten der sauren Hydrolyse weisen auf Unterschiede im Verlauf der homogen und der heterogen katalysierten Reaktion hin.

Experimenteller Teil

Hydrolyse mit Salzsäure

0,30 g Ergotamin-Base wurden mit 25 ml konz. HCl 20 Stdn. im sied. Wasserbad erhitzt. Nach Eindampfen wurde der Rückstand in 5,0 ml Citrat-Puffer, pH 3,42*, aufgenommen (Hydrolysat A).

Hydrolyse mit Kationenaustauscher

Eine Lösung von 0,30 g Ergotamin-Base in 70proz. Alkohol wurde mit 4 g Dowex 50 W-X 8 (H⁺-Form) ebenfalls 20 Stdn. im sied. Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Die Aminosäuren wurden mit 5proz. NH₃ aus dem Harz eluiert. Nach Eindampfen des Eluats im Vak. bei etwa 40 °C wurde der Rückstand in 5,0 ml Citrat-Puffer, pH 3,42*, aufgenommen (Hydrolysat B).

Ionenaustausch-Chromatographie der Hydrolysate

Ein Kationenaustauscher der Type Dowex 50 W-X 4 mit einer Siebgröße von 200—400 mesh (Na⁺-Form) wurde mit 0,1M-Citrat-Puffer, pH 3,42*, in ein Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 9—10 mm und einer Länge von 1 m gegossen, so daß eine Harzsäule von 90—95 cm Höhe entstand. Mit Hilfe eines Temperiermantels wurde bei einer konstanten Temperatur von 37,5 °C mit 0,1M-Citrat-Puffer, pH 3,42*, chromatographiert. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 4 ml/h wurden Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Es wurde jeweils 1,0 ml der Hydrolysate A und B mit Hilfe dieser Versuchsanordnung chromatographisch abgetrennt.

* 0,1M-Citrat-Puffer pH 3,42 (0,2M-Na): 21,008 g Citronensäure-Monohydrat werden in 200 ml N-NaOH gelöst, mit 690 ml dest. Wasser verdünnt, mit 110 ml N-HCl versetzt und durch tropfenweise Zugabe von N-HCl mit Hilfe eines pH-Meters genau auf pH 3,42 eingestellt.

Bestimmt man in einem aliquoten Teil der erhaltenen Fraktionen den Aminosäuregehalt mit Hilfe der Ninhydrinreaktion⁷, so erhält man Elutionskurven, durch deren Integration man die Menge der isolierten Aminosäuren errechnen kann. Die Ausbeuten an Prolin betragen aus Hydrolysat *A* (Hydrolyse mit HCl) 64%, aus Hydrolysat *B* (Hydrolyse mit Dowex) 60%. Die Prolin enthaltenden Fraktionen wurden über eine weitere Säule eines stark sauren Kationenaustauschers (Dowex 50 W-X 8, H⁺-Form) von Puffersubstanzen befreit. Aus dem Harz wurde die Aminosäure Prolin mit 5proz. NH₃ ausgewaschen. Die Eindampfrückstände der Eluate aus den Hydrolysaten *A* und *B* wurden jeweils mit 1,50 ml dest. Wasser aufgenommen. Diese Lösungen dienten zur Bestimmung des optischen Drehvermögens mittels eines Mikropolarimeters (Perkin-Elmer Mod. 141).

Meßwerte

Hydrolysat *A* (enthaltend 64 μ Mol Prolin): $\alpha = + 0,215$.

Hydrolysat *B* (enthaltend 60 μ Mol Prolin): $\alpha = - 0,265$.

Aus der Drehung einer Standardlösung von reinem L-Prolin ($[\alpha] = - 73^\circ$) wurde der Anteil an L-Prolin in den Meßlösungen errechnet.

Literatur

- ¹ *A. Hofmann, A. J. Frey und H. Ott*, *Experientia* **17**, 206 (1961).
- ² *A. Stoll*, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **IX**, 114 Wien (1952).
- ³ *W. Jacobs und L. Craig*, *J. biol. Chem.* **110**, 521 (1935).
- ⁴ *A. Stoll, T. Petrzilka und B. Becker*, *Helv. chim. Acta* **33**, 57 (1950).
- ⁵ *A. Stoll und A. Hofmann*, *Helv. chim. Acta* **33**, 1705 (1950).
- ⁶ *M. Pöhm*, *Naturwiss.* **48**, 551 (1961).
- ⁷ *S. Moore und W. Stein*, *J. biol. Chem.* **176**, 367 (1948).

Korrespondenz und Sonderdrucke:

Prof. Dr. M. Pöhm
Pharmakognostisches Institut
Universität Wien
Währinger Straße 10
A-1090 Wien
Österreich