

VERAZIN, EIN NEUES VERATRUM-ALKALOID MIT 22,26-IMINO-CHOLESTAN-GERÜST¹

G. ADAM und K. SCHREIBER

Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, DDR

J. TOMKO und A. VASSOVÁ

Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava, ČSSR

(Received in Germany 7 May 1966; accepted for publication 22 May 1966)

Abstract—The structure of verazine, $C_{27}H_{43}NO$, a new minor alkaloid from *Veratrum album* subsp. *lobelianum* (Bernh.) Suessenguth has been established. The two tetrahydroverazines A and B, obtained by catalytic hydrogenation, have been shown to be identical with (22S:25S)- and (22R:25S)-22,26-imino-5 α -cholestan-3 β -ol (IV and V), formerly synthesized by ourselves from 3 β -acetoxy-pregn-5-en-20-one. On the basis of these results as well as NMR, IR, UV, CD, ORD and mass spectroscopic investigations verazine is regarded as (25S)-22,26-imino-cholesta-5,22(N)-dien-3 β -ol (I) representing a novel structural type of *Veratrum* alkaloid of biogenetic interest.

DIE in den Karpaten vorkommende Liliaceae *Veratrum album* subsp. *lobelianum* (Bernh.) Suessenguth enthält zahlreiche Steroidalkaloide vom Jerveratrum-, Ceveratrum- und Solanidantyp.² Zu einigen strukturell bisher nicht aufgeklärten Nebenalkaloiden dieser Pflanze gehört das Verazin, über dessen Isolierung und Reindarstellung bereits früher berichtet wurde.³ Wie im folgenden näher beschrieben wird, haben wir nunmehr für diese Base die Struktur (25S)-22,26-Imino-cholestan-5,22(N)-dien-3 β -ol (I) ermittelt.

Verazin besitzt nach Elementaranalyse und Elektronenanlagerungs-Massenspektrum⁴ die Summenformel $C_{27}H_{43}NO$; es ist mit Digitonin fällbar. Nach dem Ergebnis der Mikrohydrierung⁵ enthält Verazin zwei Doppelbindungen. Die Funktion der beiden Heteroatome ergibt sich aus spektroskopischen Daten: Im IR-Spektrum von Verazin (CCl_4) finden sich OH-Banden bei 1058 und 3628 cm^{-1} . Eine weitere Bande mittlerer Intensität bei 1670 cm^{-1} ist für eine C=N-Gruppierung charakteristisch, die weiterhin durch eine schwache UV-Absorption bei 243 nm ($\log \epsilon$ 2.8) bestätigt wird. Im Elektronenanlagerungs-Massenspektrum von I findet sich neben dem (M - 1)-Peak ein (M + 14)-Peak bei m/e 411. Er ist nach unseren Befunden an anderen Verbindungen für cyclische Azomethine dieses Strukturtyps charakteristisch und wahrscheinlich auf einen Oxydationsvorgang zurückzuführen.⁶

¹ Mitteil. XI, J. Tomko, Z. Votický, G. Spittler und M. Spittler-Friedmann, *Arch. Pharm.* **299**, 347 (1966).

² J. Tomko und Š. Bauer, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **29**, 2570(1964); J. Tomko, Z. Votický, H. Budzikiewicz und L. J. Durham, *Ibid.* **30**, 3320 (1965); J. Tomko und A. Vassová, *Pharmazie* **20**, 385 (1965).

³ J. Tomko und A. Vassová, *Chem. Zvesti* **18**, 266 (1964).

⁴ Zur Methodik der Molekül-Massenspektrographie durch Elektronenanlagerung vgl. M. von Ardenne, K. Steinfelder, R. Tümmeler und K. Schreiber, *Experientia* **19**, 178 (1963).

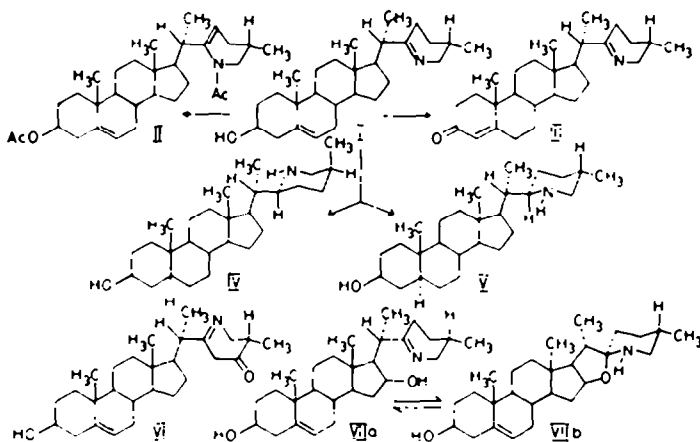
⁵ J. Hořáček und V. Pechanoc, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **27**, 1500 (1962).

⁶ M. von Ardenne, K. Steinfelder, R. Tümmeler, G. Adam und K. Schreiber, Veröffentlichung in Vorbereitung.

Das Elektronenstoss-Massenspektrum von I enthält neben dem Molekülion (m/e 397) weitere Peaks bei m/e 382, 125 und 111.

Das Vorliegen des 22,26-Imino-cholestan-Grundgerüsts, die Stellung der Hydroxygruppe und die Stereochemie des Verazins ergaben sich aus folgenden Befunden: Katalytische Hydrierung von I mit PtO_2 -Eisessig führte unter Aufnahme von 2 Moll. Wasserstoff zu einem Gemisch der beiden an C-22 stereoisomeren Tetrahydroverazine IV und V, die durch Säulenchromatographie an Al_2O_3 getrennt wurden. Beide Verbindungen erwiesen sich in allen Eigenschaften mit (22S:25S)- bzw. (22R:25S)-22,26-Imino-5 α -cholestan-3 β -ol als identisch, die von uns bereits früher aus 3 β -Acetoxy-pregn-5-en-20-on^{7,8} bzw. im Falle der (22S:25S)-Verbindung V auch aus Tomatidin⁹ synthetisiert und konfigurativ zugeordnet wurden.⁸ Die Konfiguration des Verazins an C-25 wird weiterhin durch dessen negativen Cotton-Effekt ($\Delta\epsilon - 2.04$ bei 248 nm) bestätigt, der auch bei anderen cyclischen (25S)-Azomethinen auftritt.¹⁰

Acetylierung von Verazin mit Acetanhydrid-Pyridin bei Raumtemperatur ergab ein amorphes Diacetylderivat, bei dem es sich um das $\Delta^{22(23)}$ -Acetyl-enamin II handeln dürfte.¹¹ Die Substanz weist im IR-Spektrum neben den O-Acetyl-Banden bei 1240 und 1740 cm^{-1} Max. bei 1660 (Schulter) und 1673 cm^{-1} auf, die der α,β -ungesättigten tertiären Amidgruppierung zugeordnet werden können;^{11,12} auch das UV-Spektrum (235 nm, $\log \epsilon$ 3.82) steht hiermit in Einklang.



Nach diesen Ergebnissen blieb lediglich die Lage der zweiten Verazin-Doppelbindung noch ungeklärt. Der positive Ausfall der Clarke-Reaktion,¹³ der stark

⁷ G. Adam und K. Schreiber, *Tetrahedron Letters* 943 (1963).

⁸ K. Schreiber und G. Adam, *Tetrahedron* 20, 1707 (1964).

⁹ K. Schreiber und G. Adam, *Chem. Ber.* 97, 2358 (1964).

¹⁰ H. Ripperger, K. Schreiber und G. Snatzke, *Tetrahedron* 21, 1027 (1965).

¹¹ Vgl. Y. Sato und N. Ikekawa, *J. Org. Chem.* 25, 786 (1960); Y. Sato, H. G. Latham, Jr. und N. Ikekawa, *Ibid.* 25, 1962 (1960).

¹² R. Griot und T. Wagner-Jauregg, *Helv. Chim. Acta* 42, 121, 605 (1959).

¹³ Reaktion mit Paraformaldehyd-Phosphorsäure auf Δ^4 -ungesätt. Steroidalkaloide nach E.G.C. Clarke, *Nature, Lond.* 181, 1152 (1958); vgl. K. Schreiber, U. Hammer, E. Ithal, H. Ripperger, W. Rudolph und A. Weissenborn, *Tagungsber. Dtsch. Akad. Landwirtschaftswiss. Berlin* Nr. 27, 47 (1961).

negative Drehungsbeitrag der Doppelbindung $[(M)_D \text{ von I } -364^\circ] - [(M)_D \text{ von (25S)-22,26-Imino-5}\alpha\text{-cholest-22(N)-en-3}\beta\text{-ol}^{14} -162^\circ] = \Delta[M]_D -202^\circ$ sowie das IR-Spektrum (C—O-Bande bei 1058 cm^{-1})¹⁵ deuteten auf eine Δ^5 -Doppelbindung. Auch das NMR-Spektrum von Verazin steht mit dem Vorliegen einer 3β -Hydroxy- Δ^5 -Gruppierung in Einklang: Triplett bei $\delta = 5.30 \text{ ppm}$ (Vinylproton an C-6), Singulets bei $\delta = 1.00$ (C-19-Methyl; ber. nach Zürcher¹⁶ 1.02 ppm) und 0.70 ppm (C-18-Methyl). Damit in Übereinstimmung lieferte Verazin bei Oppenauer-Oxydation ein α,β -ungesättigtes Keton (III), das im IR-Spektrum entsprechende Banden bei 1625 und 1685 cm^{-1} , im UV die erwartete Absorption bei 242 nm ($\log \epsilon 4.14$) und bei der ORD-Messung in Äthanol einen mit dem von Cholest-4-en-3-on übereinstimmenden negativen Cotton-Effekt bei ca. 315 nm ¹⁷ zeigt.

Bei Verazin handelt es sich somit um (25S)-22,26-Imino-cholesta-5,22(N)-dien-3 β -ol (I), also um ein *Veratrum*-Alkaloid neuartigen Strukturtyps, das enge strukturelle Beziehungen vor allem zu einigen *Solanum*-Alkaloiden aufweist. So unterscheiden sich Verazin (I) und das aus *S. tomatillo* Phil. isolierte Tomatillidin (VI)¹⁸ lediglich durch eine unterschiedliche Konfiguration an C-25 sowie durch das Fehlen bzw. Vorhandensein einer 24-Keto-Gruppe.¹⁹ Auch das Spirosolan-Alkaloid Tomatid-5-en-3 β -ol²⁰ kann als 16β -Hydroxy-Derivat des Verazins aufgefasst werden, obgleich es nicht als Ring-E-offenes Azomethin (VIIa), sondern in der tautomeren Spiroaminoketalform VIIb vorliegt.

16-Unsubstituierte Cholestan-Alkaloide wie Verazin (I) besitzen allgemeines biogenetisches Interesse. Bereits früher ist von uns mehrfach darauf hingewiesen worden, dass cyclischen Azomethinen vom Typ I eine zentrale Stellung bei der Biosynthese der Cholestan-Alkaloide zukommen dürfte.²¹ Das Vorkommen von I als Nebenalkaloid in *Veratrum album* lässt vermuten, dass es sich hier um ein Intermediärprodukt auch der Ceveratrum- und Jerveratrum-Alkaloidbiosynthese handelt.²²

EXPERIMENTELLER TEIL

Schmelzpunkt (Mikroheiztisch nach Boëtius) sind korrigiert. Spezifische Drehungen in Chf., wenn nicht anders angegeben. IR-Spektren: Zeiss-Zweistrahl-Spektralphotometer UR 10.

¹⁴ G. Adam und K. Schreiber, *Angew. Chem.* **76**, 752 (1964); *Angew. Chem.* (Internat. Edit.) **3**, 633 (1964).

¹⁵ T. Masamune, M. Takasugi, H. Suzuki, S. Kawahara, M. Gohda und T. Irie, *Bull. Chem. Soc., Japan* **35**, 1749 (1962).

¹⁶ Vgl. N. S. Bhacca, und D. H. Williams, *Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry—Illustrations from the Steroid Field*, Holden-Day, San Francisco-London-Amsterdam (1964).

¹⁷ Vgl. C. Djerassi, *Optical Rotatory Dispersion*, S. 61. McGraw-Hill, New York (1960); P. Crabbé, *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, S. 191. Holden-Day, San Francisco-London-Amsterdam (1965).

¹⁸ E. Bianchi, C. Djerassi, H. Budzikiewicz und Y. Sato, *J. Org. Chem.* **30**, 754 (1965).

¹⁹ Nach Angaben von Y. Sato (briefliche Mitteilung vom 26.10.1965) soll ein Verazin analoges Steroidalkaloid, und zwar das von uns bereits früher synthetisierte⁸ (25R)-22,26-Imino-5 α -cholest-22(N)-en-3 β -ol, in *S. congestiflorum* Dun. vorkommen.

²⁰ K. Schreiber und H. Rönsch, *Tetrahedron Letters* **329** (1963); *Liebig's Ann.* **681**, 187 (1965).

²¹ K. Schreiber und H. Ripperger, *Liebig's Ann.* **655**, 114 (1962); G. Adam und K. Schreiber, *Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen—Festschrift Kurt Mothes zum 65. Geburtstag*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965, S. 31; K. Schreiber, 3. Internat. Symposium *Biochemie und Physiologie der Alkaloide* vom 24.-27. 6. 1965 in Halle; *Abhandl. deut. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol.* im Druck.

²² Vgl. u. a. C.R. Narayanan, in L. Zechmeister, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **20**, 298 (1962).

UV-Spektren bzw. ORD Kurve: Perkin-Elmer-Spektralphotometer 137 und UV ORD/UV-5 JASCO-Spektropolarimeter. CD: Roussel-Jouan-Dichrograph. NMR-Spektrum: Varian-Associates-Spektrometer, Modell A-60. Elektronenanlagerungs-Massenspektren: Molekül-Massenspektrographen des Forschungsinstituts M. von Ardenne, Dresden. Elektronenstoss-Massenspektrum: MCH-1303-Spektrometer. Säulenchromatographie: Al_2O_3 (Woelm, basisch), standardisiert nach Brockmann, der Aktiv.-Stufe III. Dünnschichtchromatographie: Kieselgel G (Merck) bei Entwicklung mit Chf.-MeOH 97:3 bzw. Al_2O_3 (VEB Chemiewerk Greiz-Döblau), standard. nach Brockmann, mit 10% Gipszusatz und Äther-MeOH 50:2 als Laufmittel; Steighöhe ca. 20 cm; Detektion mit Jodreagenz (0.5 g Jod + 1 g KJ/l Wasser).

(25S)-22,26-*Imino-cholesta-5,22(N)-dien-3 β -ol* (Verazin, I). Isoliert aus *Veratrum album* nach bereits früher beschriebener Methodik.⁹ Schmp. 176–178°, $[\alpha]_D^{25}$ –89.7° (C_3H_7OH) bzw. –91.7° (Chf.); NMR-Spektrum ($CDCl_3$, TMS): Triplett bei $\delta = 5.30$ ppm (Vinylproton an C-6), Singulett bei $\delta = 1.00$ (C-19-Methyl) und 0.70 ppm (C-18-Methyl); UV-Spektrum (C_3H_7OH): 243 nm, $\log \epsilon$ 2.8; IR-Spektrum (CCl_4): 1058 (OH), 1670 (C=N), 3280 und 3628 (OH); Elektronenanlagerungs-Massenspektrum (Verdampfungstemp. 160°): m/e 411 (M + 14), 410 (M + 13), 396 (M – 1), 378 (M – 1 – 18, Wasserabspaltung); Elektronenstoss-Massenspektrum: m/e 397, 382, 125 und 111; CD (Dioxan, $c = 0.729$ g/l): $[\theta]_{270}^{25}$ 0, $[\theta]_{266}^{25} + 264$, $[\theta]_{270}^{25}$ 0, $[\theta]_{266}^{25} - 6730$, $[\theta]_{266}^{25} - 6100$.

Diacetylderivat II. Verazin I (20 mg) wurde mit 1 ml Ac_2O und 1 ml Pyridin 20 Stdn. bei Raumtemp. acetyliert. Anschliessend wurde mit Eiswasser versetzt, durch Zugabe von verd. Ammoniak alkalisiert und mit Äther extrahiert. Der Äther wurde abdestilliert und der Rückstand (24 mg) an saurem Al_2O_3 (Aktiv.-Stufe IV) chromatographiert. Elution mit Äther ergab 10 mg dünnschichtchromatographisch einheitliche (SiO_2 , R_f 0.57, Ausgangsmaterial I R_f 0.14) amorphe Substanz mit $[\alpha]_D^{25} + 9^\circ$ ($c = 0.373$, C_3H_7OH). IR-Spektrum: 1240 und 1740 (O-Acetyl), 1660 (Schulter) und 1673 cm^{-1} (α, β -ungesätt. t.-Amidgruppierung); UV-Spektrum (C_3H_7OH): 235 nm, $\log \epsilon$ 3.82.

(25S)-22,26-*Imino-cholesta-4,22(N)-dien-3-on* (III). Verazin I (13 mg) wurde in 15 ml Toluol und 3 ml Cyclohexanon gelöst. Nach Abdestillieren von 3 ml Lösungsmittel wurde mit 40 mg Aluminiumphenolat versetzt und 4 Stdn. unter Rückfluss erhitzt. Mehrmalige Extraktion mit 5-proz. AcOH, Alkalisieren der vereinigten sauren Extrakte mit verd. Ammoniak und nochmalige Extraktion mit Chf. lieferte 12 mg Rückstand, der an Al_2O_3 chromatographiert wurde (Fraktionen zu 1 ml). Elution mit Äther lieferte 3 mg dünnschichtchromatographisch einheitliches (SiO_2 , R_f 0.39, Ausgangsmaterial I R_f 0.14) amorphes III, $[\alpha]_D^{25} + 17^\circ$ ($c = 0.186$, C_3H_7OH). Das Elektronenanlagerungs-Massenspektrum (Verdampfungstemp. 150°) zeigt das für Verbindungen mit 3-Oxo- Δ^4 - bzw. Azomethin-Gruppierung charakteristische⁹ Muster. IR-Banden bei 1625 und 1685 cm^{-1} (α, β -ungesätt. Keton); UV-Spektrum (C_3H_7OH): 242 nm ($\log \epsilon$ 4.14); ORD (C_3H_7OH , $c = 2.0$ g/l): $[\alpha]_{260}^{25} - 315^\circ$, $[\alpha]_{260}^{25} + 1170^\circ$ (breite Schulter), $[\alpha]_{260}^{25} + 1260^\circ$.

(22S:25S)- bzw. (22R:25S)-22,26-*Imino-5 α -cholestan-3 β -ol* (Tetrahydroverazin A und B, IV bzw. V). Verazin I (45 mg) wurde in 5 ml CrO_3 -stabilem Eisessig gelöst und nach Zusatz von 50 mg PtO_2 bei Raumtemp. hydriert. Die berechnete Wasserstoffmenge (13 ml) wurde innerhalb 2 Stdn. aufgenommen. Die filtrierte Lösung wurde mit verd. Ammoniak unter Kühlung alkalisiert und der ausgefallene gelartige Niederschlag 5mal mit Methylenchlorid extrahiert. Waschen der vereinigten Extrakte mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen i. Vak. ergab 42 mg öligen Rückstand, der nach dem Dünnschichtchromatogramm (Al_2O_3) aus den beiden Tetrahydroverazinen IV und V vom R_f 0.61 bzw. 0.18 bestand. Daneben traten zwei schwache Flecken vom R_f 0.54 und 0.32 auf¹⁰. Das Gemisch (42 mg) wurde in 3 ml Benzol gelöst an 3.5 g Al_2O_3 chromatographiert (Fraktionen zu 25 ml). Die Frakt. 1–7 wurden mit Benzol, 8–19 mit Benzol-Äther 95:5, 20–24 mit Benzol-Äther 9:1, 25–27 mit Benzol-Äther 8:2 und 28–31 mit Benzol-Äther 1:1 eluiert. Die öligen Rückstände der Frakt. 9–14 enthielten 26 mg durch wenig Nebenprodukt vom R_f 0.54 verunreinigtes IV, das nach Kristallisation aus MeOH-Wasser Nadeln vom Schmp. 180–184° und $[\alpha]_D^{25}$

¹⁰ Das Nebenprodukt mit R_f 0.54 korrespondiert im dünnschichtchromatographischen Verhalten mit einem von uns früher in geringen Mengen synthetisch erhaltenen (20R:22 ϵ :25 ϵ)-22,26-*Imino-5 α -cholestan-3 β -ol* (vgl.⁹). Dies würde bedeuten, dass Verazin noch geringe Mengen des 20-isomeren Alkaloids enthält.

+4.1° ($c = 0.594$) lieferte. Die Verbindung erwies sich nach Mischschmp., IR-Spektrum und Dünnschichtchromatogramm mit synthetischem IV (Schmp. 182–184°, $[\alpha]_D^{25} + 2.3^\circ$)⁸ als identisch. Die Fraktt. 15–19 enthielten 4 mg öliges ungetrenntes Material vom R_f 0.61, 0.54 und 0.32. Die Fraktt. 20–29 lieferten 7 mg spontan kristallisierende Substanz vom R_f 0.18. Nach Umkristallisieren aus MeOH-Wasser lange Nadeln vom Schmp. 217–219° und $[\alpha]_D^{25} + 21.4^\circ$ ($c = 0.374$), die in allen Eigenschaften mit synthetischem V (Schmp. 218–220°, $[\alpha]_D^{25} + 22.2^\circ$)⁷⁻⁹ identisch waren.

Wir danken den Herren Prof. C. Djerassi, Stanford, California, für die Aufnahme des NMR-Spektrums, Dr. R. Tümmler, Dresden, für die Elektronenanlagerungs-Massenspektren, Dr. L. Dolejš und Dr. V. Hanuš, Prag, für das Elektronenstoss-Massenspektrum, Dr. H. Ripperger, Gatersleben, für das Circulardichrogramm sowie Dipl.-Ing. I. Sticzay, Bratislava, für die Aufnahme der ORD-Kurve.