

A. Nahrstedt

## Die Isomerisierung von Amygdalin und Homologen\*

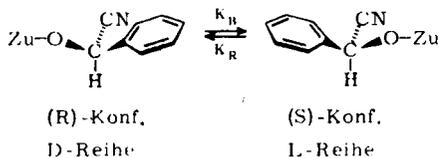
Aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg i. Brsg.  
(Eingegangen am 18. Dezember 1974).

Es wird die Isomerisierung von Amygdalin im chiralen Zentrum des Aglykons in verschiedenen Lösungsmitteln und in Abhängigkeit von Temperatur und pH untersucht. Reaktionsordnung, Geschwindigkeitskonstanten und Aktivierungsenergien werden angegeben. Auf Grund dieser Daten wird ein Vorschlag zum Reaktionsmechanismus gemacht und die Bedeutung der Befunde für die Bearbeitung von Benzaldehydcyanhydringlykosiden diskutiert.

### The Isomerisation of Amygdalin and Its Homologues

The influence of temperature, pH and different solvents on isomerisation in the chiral centre of amygdalin is investigated. The order of reaction, constants of velocity and activation energies are given. The possible mechanism of this reaction and the importance of these findings with regard to treatment of mandelonitrile glycosides are discussed.

Benzaldehydcyanhydringlykoside besitzen im Aglykon ein chirales Zentrum, dessen Konfiguration unter Einwirkung schwacher Basen (z.B. 0,005 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) umkehrbar ist<sup>1)</sup>:



Nach unseren Untersuchungen an einer Reihe von Benzaldehydcyanhydringlykosiden stellt sich bei der Isomerisierung in Ammoniak ein Gleichgewicht von ca. 43 % (R)- zu ca. 57 % (S)- Form ein<sup>2)</sup>. Die entstandenen Diastereomergemische lassen sich gaschromatographisch als TMS-Aether gut trennen<sup>2,3)</sup>.

\* Herrn Professor Dr. *Richard Pohl* zum 65. Geburtstag am 28. Juni 1975 gewidmet.

1 Beilsteins Handbuch der org. Chemie, 4. Aufl. Bd. 31 Springer Verlag, Berlin 1938.

2 A. Nahrstedt, *Planta med.* 24, 83 (1973).

3 A. Nahrstedt, *Phytochemistry* 12, 2799 (1973).

Diastereomergemische als Isolierungsartefakte von Cyanglykosiden sind in der älteren Literatur häufig zu finden, so z.B. das lange Zeit als einheitliches Cyanglykosid betrachtete Prulaurasin<sup>4)</sup>, ein aus Prunasin (R) und Sambunigrin (S) bestehendes Gemisch<sup>5)</sup>. In jüngster Zeit sind erneut Diastereomergemische von Cyanglykosiden aus einer Pflanze isoliert worden: Holocalin/Zierin aus *Holocalyx balansac*<sup>3)6)</sup> und Prunasin/Sambunigrin aus *Sambucus nigra*<sup>7)</sup>. Diese Ergebnisse sind deshalb erstaunlich, weil im Verlauf der Biosynthese cyanogener Glykoside aus Aminosäuren<sup>8)</sup> am Beispiel von Lotaustralin gezeigt wurde, daß die Konfiguration am  $\beta$ -C-Atom der Aminosäure über alle Biosyntheseschritte erhalten bleibt<sup>8)</sup> und die Einführung der Hydroxylgruppe, die dann glykosidiert wird, stereospezifisch von einer mischfunktionellen Oxygenase erfolgt<sup>9)10)</sup>.

Inzwischen wurden uns Amygdalin-Präparate pro injectione (Verwendung siehe bei<sup>11)</sup>) zur Prüfung vorgelegt, die sämtlich Diastereomergemische aus Amygdalin (R) und Neoamygdalin (S) enthielten, obwohl sie pH-Werte im sauren Bereich aufwiesen; das Amygdalin war jedoch bei der Konfektionierung der Ampullen in wäßriger Lösung erhitzt worden.

Es erschien uns deshalb sinnvoll, mit Hilfe gaschromatographischer Methoden<sup>2)</sup> die Gesetzmäßigkeit der Isomerisierung anhand der Modellsubstanz Amygdalin näher zu untersuchen, vor allem im Hinblick auf Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden für diese Substanzklasse.

Vorversuche zeigten, daß Amygdalin bereits in dest. Wasser bei höheren Temperaturen ohne konkurrierende Abbaureaktionen isomerisiert. Bei konstanter Temperatur von 100° zeigt die Isomerisierung den in Abb. 1 gezeigten zeitlichen Verlauf. Unter Berücksichtigung der Rückreaktion entspricht das Konzentrations-Zeit-Diagramm einer Reaktion erster Ordnung mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_B = 3,4 \times 10^{-4}$  und  $k_R = 2,6 \times 10^{-4}$ . Bestimmt man den Umsatz nach einer für alle Experimente konstanten Zeit von 2 h bei verschiedenen Temperaturen, so erhält man das in Abb. 2 gezeigte Diagramm. Die aus diesen Werten ermittelte Aktivierungsenergie nach der Arrhenius-Gleichung<sup>12)</sup> liefert für Amygdalin eine Aktivierungsenergie von etwa 21 kcal/Mol in Wasser.

Bei höheren Temperaturen läuft die Isomerisierung auch in absol. Äthanol ab, (Abb. 2). Die Ermittlung der Aktivierungsenergie ergibt für Äthanol eine Aktivie-

4 M. Hadders und C. Wehmer in: Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. III/2, Springer Verlag, Wien 1932.

5 V. Plouvier, C.R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. Paris 200, 1985 (1935).

6 R. Gmelin, M. Schuler und E. Bordas: *Phytochemistry* 12, 457 (1973).

7 S.R. Jensen und B.J. Nielsen: *Acta chem. scand.* 27, 2661 (1973).

8 E.E. Conn, *Biochem. Soc. Symposia* 38, 277 (1973).

9 H. Zilg, A. Brian, A. Tapper und E.E. Conn: *J. biol. Chemistry* 247, 2348 (1972).

10 F.H. Bisset, R.C. Clapp, R.A. Coburn, M.G. Ettliger und L. Long: *Phytochemistry* 8, 2235 (1969).

11 P.G. Reitnauer, *Arzneimittel-Forsch.* 22, 1347 (1972).

12 H.R. Christen, *Grundlage der allgemeinen und org. Chemie*, Salle Verlag, Frankfurt/M. 1969.

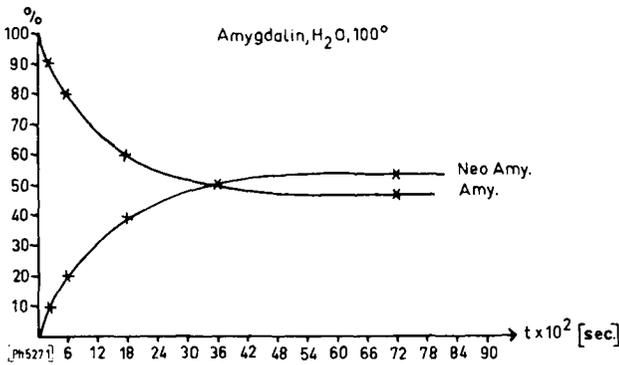


Abb. 1

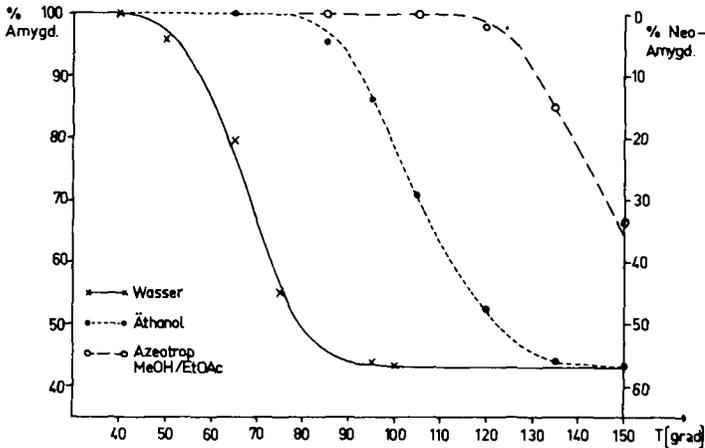


Abb. 2

rungsenergie von etwa 30 kcal/Mol, die erwartungsgemäß größer ist als diejenige für Wasser. Wird die Polarität des Lösungsmittels weiter reduziert, etwa durch Wahl des Azeotropes Methanol/Äthylacetat, das wir zur Extraktion cyanogener Glykoside verwenden<sup>13)</sup>, tritt innerhalb der Versuchsdauer Neoamygdalin als Reaktionsprodukt erst weit oberhalb des Siedepunktes des Azeotropes (61,5°) auf (Abb. 2). Die rechnerische Ermittlung der Aktivierungsenergie<sup>12)</sup> lieferte für das Azeotrop eine Aktivierungsenergie von etwa 60 kcal/Mol.

Aus den bisherigen Daten ist bereits zu entnehmen, daß eine alkalische Lösung für die Isomerisierung nicht notwendig ist. Versuchsansätze von 30 min Dauer bei 60° in gepuffertem Wasser bestätigten dies. Danach setzt unter den gewählten Bedingungen bereits bei einem pH von weniger als 7 die Isomerisierung deutlich ein. Eine

<sup>13</sup> A. Nahrstedt, Dissertation Freiburg 1971.

Steigerung der OH-Ionen-Konzentration führt zu einer Beschleunigung der Reaktion und zu einer Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten von über zwei Zehnerpotenzen zwischen pH 6,20 und 7,75 (Abb. 3).

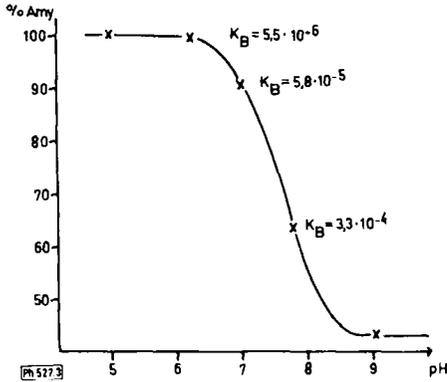
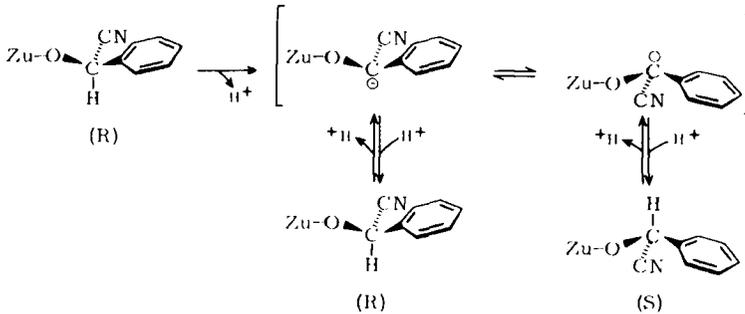


Abb. 3

Ausgehend von der Molekülstruktur und den erhaltenen Meßdaten schlagen wir folgenden Reaktionsmechanismus für die Isomerisierung vor:



Auf Grund der stark elektronenziehenden Gruppen am Asymmetriezentrum des Aglykons ist zu erwarten, daß der Wasserstoff als Proton absplattbar ist<sup>14)</sup>. Hieraus resultiert ein ausreichend resonanzstabilisiertes Carbanion, dessen pyramidale Struktur umklappen kann und damit zu einer Konfigurationsumkehr am chiralen Zentrum führt. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgt auf der Stufe des Carbanions; nach der elektrophilen Substitution durch Lösungsmittelprotonen liegen beide diastereomeren Glykoside vor.

14 E.S. Gould, Mechanismus und Struktur in der org. Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

Die Ablösung des Protons erfolgt bei der Bildung von Carbanionen relativ langsam<sup>14)</sup> sie bildet den die Reaktionsgeschwindigkeit der Isomerisierung bestimmenden Schritt, welcher sich zumindest für Wasser mit dem gemessenen Reaktionsablauf nach erster Ordnung deckt. OH-Ionen als Protonenakzeptoren beschleunigen die Bildung des Anions. Sie ist ebenfalls abhängig von der Lösungsmittelpolarität und von der Zufuhr der für die Ionisation der CH-Bindung notwendigen Energie, deren Wert von ca. 21 kcal/Mol in Wasser in der Größenordnung der Aktivierungsenergie ähnlicher Spaltungen liegt (z.B.<sup>15)</sup>). Die Annahme, daß sich als Zwischenprodukt der Reaktion ein Carbanion bildet, wird durch den Einbau von Deuterium bei der Isomerisierung in D<sub>2</sub>O indirekt bestätigt. Ein NMR-Spektrum des in H<sub>2</sub>O isomerisierten Amygdalins zeigt bei  $\delta = 5,50$  (H<sub>(R)</sub>) und  $\delta = 5,57$  (H<sub>(S)</sub>) ein Singulett für das jeweilige Methinproton (Abb. 4a). Bei in D<sub>2</sub>O isomerisiertem Amygdalin sind in diesem Bereich keine Signale mehr zu beobachten (Abb. 4b).

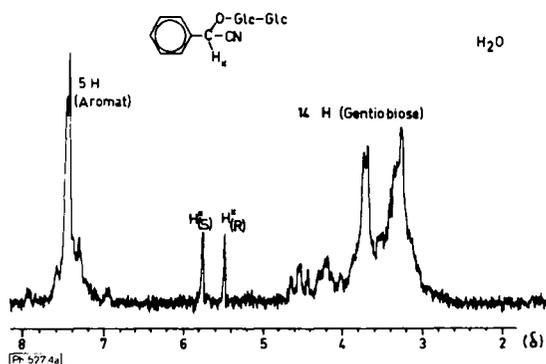


Abb. 4a

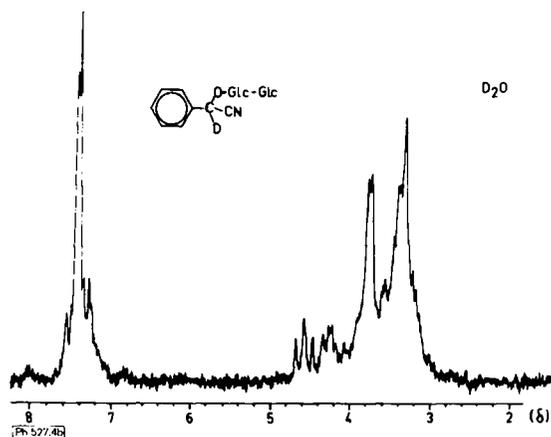


Abb. 4b

15 C.H. Bamford und C.F.H. Tapper (edit): Comprehensive Chemical kinetic Bd. V, Elsevier publ. comp., Amsterdam 1972.

Zwischen den verschiedenen Homologen der Benzaldehydcyanhydringlykoside sollte es danach keine prinzipiellen Unterschiede geben. Geringe Abweichungen in der Bildungsgeschwindigkeit des Carbanions können durch Ringsubstitution, Änderungen des Lösungsmiteleinflusses durch Ringsubstitution und/oder Änderung des Zuckerteiles infolge unterschiedlicher Solvatation verursacht werden. Eine Ausnahme bildet das am Ring p-OH-substituierte Dhurrin, dessen Alkali-Labilität beschrieben ist<sup>16)</sup> und bei dem uns eine Isomerisierung sowohl in Wasser als auch in absol. Äthanol nicht gelang. Stattdessen war ein zunehmender Abbau unter Freisetzung von Glucose zu beobachten. Hier scheint die Phenolat-Bildung bevorzugt abzulaufen und damit eine Degradation des Moleküls nach<sup>16)</sup> stattzufinden.

Im Einklang mit dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus steht auch die Beobachtung, daß Cyanhydringlykoside mit aliphatischer Seitenkette (z.B. Lot-australin) wesentlich schwerer oder gar nicht isomerisieren<sup>17)</sup>, da hier der elektronenziehende und das Carbanion stabilisierende Aromat fehlt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen es ratsam erscheinen, bei der Bearbeitung von Blausäureglykosiden der Benzaldehydcyanhydrin-Reihe der Wahl der Lösungsmittel und der Wärmebelastung sorgfältige Beachtung zu widmen, um Artefakte in Form diastereomerer Gemische zu vermeiden.

### Beschreibung der Versuche

Es wurde Amygdalin reinst der Fa. Roth, Karlsruhe, verwendet. Für die Versuchsreihen „pH-Abhängigkeit“ und „Temperaturabhängigkeit“ wurden die Reaktionen in zugeschmolzenen Glasampullen\* mit 2 ml einer 0,1proz. Lösung von Amygdalin im jeweiligen Lösungsmittel bzw. Puffer durchgeführt.

Die Reaktionsansätze wurden nach der angegebenen Reaktionszeit sofort tief gekühlt, gefriergetrocknet, mit 1 ml trockenem Pyridin aufgenommen und mit 0,2 ml Hexamethyldisilazan und 0,1 ml Trimethylchlorsilan bei Raumtemp. silyliert. Ein aliquoter Teil des Silylierungsansatzes wurde direkt in den GC injiziert.

*GC-Bedingungen:* Gerät: Varian 1200

Säule: OV-1, 3 % auf Chromosorb AW-DMCS 80–100 mesh, 3 m x 1/8",  
Stahl

Temp.: 240–260°, 1°/min; Trägergas: Stickstoff, 25 ml/min; Injektor: 250°;  
Detektor: 300°.

Die Auswertung der GC-Signale erfolgte mit Hilfe der näherungsweise Flächenbestimmung Höhe x Breite in halber Höhe.

16 C.H. Mao und L. Anderson: *J. org. Chemistry* 30, 603 (1965).

17 R. Eyjolfsson, *Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe* Bd. 28, p. 74, Springer Verlag, Berlin 1970.

\* Resistenzgruppe A (DAB 7), wassergespült.

**NMR-Spektroskopie:** Die in H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O und Ammoniak isomerisierten Ansätze wurden gefriergetrocknet und nach<sup>18)</sup> silyliert und aufgearbeitet. Es wurden jeweils 50 mg Amygdalin eingesetzt. Die NMR-Spektren wurden in Tetrachlorkohlenstoff mit einem Varian T 60 NMR aufgenommen.

**Ermittlung der Reaktionsordnung und Geschwindigkeits-Konstanten:**

$$\frac{x_t - x_{G1}}{x_o - x_{G1}} = e^{-(k_B + k_R)t} \quad (1)$$

$$k_B = K \cdot x_{G1}(k_R + k_B) \quad (2)$$

$$k_R = x_{G1}(k_R + k_B) \quad (3)$$

$x_t$  = Molenbruch von Amygdalin zur Zeit  $t$

$x_{G1}$  = Molenbruch von Amygdalin zur Zeit  $t = 00$

$x_o$  = Molenbruch von Amygdalin zur Zeit  $t = 0$

$K$  = Gleichgewichtskonstante der Reaktion

$k_B$  = Geschwindigkeitskonstante der Bildung von Neoamygdalin

$k_R$  = Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion

**pH-Abhängigkeit:** 1 ml wässrige Amygdalinlösung (2 mg/ml) wurde mit 1 ml Citrat/Phosphat/NaOH-Puffer versetzt, dessen pH bei 60° mit der Glaselektrode ermittelt worden war. Reaktionsbedingungen: jeweils 30 min bei 60° im Wasserbad.

pH	5,01	6,20	6,98	7,75	9,02
Amygd. (%)	100	99,0	90,4	63,0	42,5
NeoA. (%)	—	1,0	9,6	27,0	57,5
$k_B(x 10^{-5})$	—	0,5	5,8	33	—

**Temperaturabhängigkeit:** Reaktionsdauer jeweils 120 min im Ölbad:

	0	40	50	65	75	85	95	105	120	135	150
H <sub>2</sub> O % Amygd.		100	95,5	79,5	55	46	44	—	—	—	—
% NeoA.		0	4,5	20,5	45	54	56	—	—	—	—
$k_B(x 10^{-5})$		—	0,72	3,6	12	23	—	—	—	—	—
EtOH % Amygd.		—	—	100	—	95	86	71	52,5	44	43,5
% NeoA.		—	—	0	—	5	14	29	48,5	56	56,5
$k_B(x 10^{-5})$		—	—	—	—	0,72	2,2	5,6	14,6	40,8	—
MeOH/% Amygd.		—	—	—	—	100	—	100	98	85	67
EtOAc/% NeoA.		—	—	—	—	0	—	0	2	15	33
$k_B(x 10^{-5})$		—	—	—	—	—	—	—	0,27	2,4	6,8

18 T.J. Mabry, K.R. Markham and M.B. Thomas: The systematic identification of flavonoids, Springer Verlag, New York 1970.

*Reaktionsgeschwindigkeit:* Lösungsmittel Wasser, 20 mg Amygdalin/25 ml, Siedetemp., Probenentnahmen jeweils 2 ml nach der angegebenen Zeit.

t (sec)	300	600	1800	3600	7200
% Amygd.	90,5	80,0	60,5	50,5	44,0
% NeoA.	9,5	20,0	39,5	49,5	56,0
$k_B(x10^{-4})$	3,4	4,1	3,7	3,2	3,2

Herrn Dr. *M. Brugger*, Pharmaz. Institut, danke ich herzlich für die Aufnahme der NMR-Spektren, Herrn Prof. Dr. *E.E. Conn*, Davis USA, für die Überlassung einer Probe Dhurrin.

Anschrift: Dr. Adolf Nahrstedt, 78 Freiburg/Brsg., Schänzlestr. 9/11.

[Ph 527]

W. Klein, W. Back und E. Mutschler

**Potentielle Analgetika, 5. Mitt.**

## Über die Synthese und pharmakologische Wirkung cyclischer Analoga des Fentanyls

Aus dem Fachbereich Biochemie und Pharmazie, Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/Main und dem Fachbereich Pharmazie der Universität Mainz.  
(Eingegangen am 20. Dezember 1974)

Cyclische Analoga des Fentanyls wurden dargestellt und pharmakologisch untersucht. Durch Verknüpfung der Acyl-Seitenkette mit C-2 des Aromaten und der damit verbundenen Änderung der stereochemischen Struktur geht die analgetische Wirkung des Fentanyls verloren, jedoch besitzen die Verbindungen starke antihistaminische Eigenschaften.

### Synthesis and Pharmacological Activities of Cyclic Analogues of Fentanyl

Cyclic analogues of fentanyl were synthesized and pharmacologically tested. Cyclisation of the acyl group with C-2 of the aromatic ring yielded a change in stereochemical structure. Therefore the analgesic activity of fentanyl was lost and strong antihistaminic activities appeared.

Vergleicht man die chemische Struktur des Fentanyls mit der des Benzperidols, so läßt sich folgendes gemeinsame Strukturmerkmal feststellen: Beiden Verbindungen