

1618. K. Winterfeld und H. Pies

d- α -Isolupanin, ein Nebenalkaloid der blauen Lupine

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 19. Mai 1957)

Neuere Beobachtungen¹⁾ legen die Vermutung nahe, daß außer d-Lupanin und Oxylupanin²⁾, noch mit dem Auftreten weiterer Alkaloide in den Samen der blauen Lupine (*Lupinus angustifolius* L.) zu rechnen ist.

Zur Klärung dieser Frage stand uns ein methanolischer Extrakt aus 50 kg reifem Samen der blauen Lupine zur Verfügung. Zur Entfernung des reichlich vorhandenen Eiweißes wurde dieses mit verdünnter Salzsäure hydrolysiert. Die sauer und alkalisch ausschüttelbaren Alkaloidgemische chromatographierten wir aufsteigend in einem Butanol-Salzsäure-Wassergemisch. An Hand von Vergleichschromatogrammen konnte die Anwesenheit von Lupanin und Oxylupanin (siehe Abb. 1) festgestellt werden.

Im Gegensatz zum Vergleichschromatogramm ist der aus der alkalischen Ausschüttelung erhaltene Lupaninfleck auffallend langgestreckt und in der Mitte leicht eingekerbt. Bei der starken Säurekonzentration des Butanol-Salzsäure-(37%ig)-Wassergemisches war jedoch eine „Schwanzbildung“, hervorgerufen durch eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Elektrolyt- und Nichtelektrolytform ausgeschlossen³⁾. Daher lag der Verdacht nahe, daß Lupanin von einem Alkaloid mit annähernd gleichem R_f -Wert begleitet ist. Bei einem absteigenden Chromatogramm von längerer Laufstrecke gelang es, den geschwänzten Fleck so weit auseinanderzuziehen, daß zwei Zentren erkennbar waren.

Erst das zweidimensionale Verfahren, bei dem das absteigende Durchlaufchromatogramm in der anderen Richtung mit dem aufsteigenden Verfahren (Butanol-Butylacetat-Eisessig-Wasser) kombiniert wurde, lieferte zwei Flecke mit verschiedenen R_f -Werten.

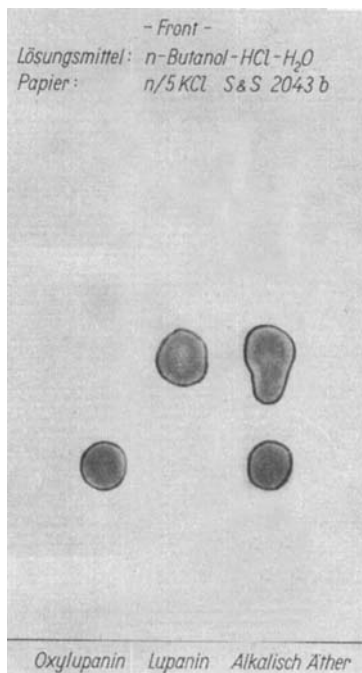


Abb. 1

¹⁾ A. Kneuer: Inauguraldissertation Freiburg/Br. 1929; K. Winterfeld und A. Kneuer, Chem. Ber. 64, 150 u. ff. (1931); M. Rink, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 285, 187 (1952).

²⁾ A. Beckel, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 250, 691 u. ff. (1912).

³⁾ H. Bräuniger, Pharmazie 8, 643 (1954).

Die Auftrennung des Alkaloidgemisches in Lupanin, Oxylupanin und die neue Base gelang über die Bitartrate. Lupanin lieferte ein gut kristallisierendes Bitartrat, die beiden anderen Alkaloide zeigten keine Neigung zur Kristallisation.

Der auf diese Weise vom Lupanin befreite syrupöse Alkaloidrückstand zeigte im Chromatogramm beim $R_f = 0,5$ (Lupanin) nur einen hauchdünnen Schleier, bei $R_f = 0,46$ den Flecken der neuen Base. Ihre Trennung vom Oxylupanin gelang in der Hochvakuumdestillationsapparatur von Jantzen-Hamburg. Von den drei erhaltenen Fraktionen enthielt die mittlere die neue Base „A“, Schmp. 75° .

Die Summenformel wurde zu $C_{15}H_{24}N_2O$, die spezifische Drehung zu $[\alpha]_D^{28} = -55,6^\circ$ (Methanol) ermittelt.

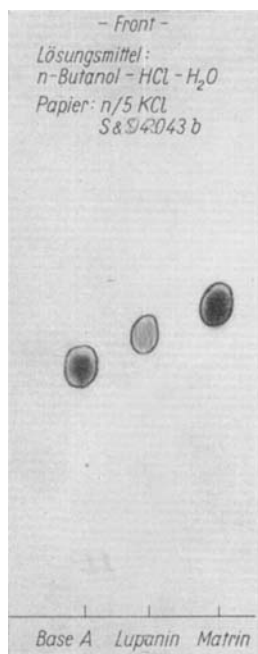


Abb. 2

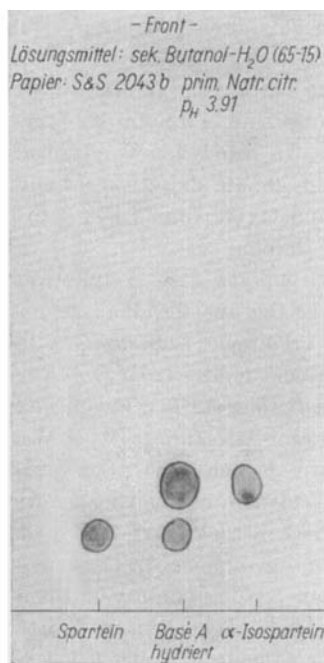


Abb. 3

Alle diese Daten stimmten mit einer schon von A. Kneuer (l. c.) in den Samen der blauen Lupine aufgefundenen und mit „Lupanidin“ bezeichneten Base überein. Die gleichen Eigenschaften und die gleiche Zusammensetzung besitzen auch die Alkaloide Matrin und α -Isolupanin. Ein Vergleichschromatogramm mit Matrin ergab einen anderen R_f -Wert (0,56).

d- α -Isolupanin, das wir zum Vergleich mit der Base „A“ durch Dehydrierung des d-Lupanins mit Mercuriacetat¹⁾ und anschließende Hydrierung des Dehydro-

¹⁾ L. Marion und N. J. Leonard, Canad. J. Chem. 29, 355 (1951).

lupanins darstellten, zeigte vollkommene Übereinstimmung im R_f -Wert mit der Base „A“. Wie d- α -Isolupanin läßt sich auch die Base „A“ katalytisch zum l- α -Isosparteïn reduzieren. Da die Base „A“ noch von geringen Spuren von d-Lupanin begleitet war, zeigte das Hydrierungsprodukt (Abb. 3) nur geringe Neigung zur Kristallisation. Erst als das bei der Hydrierung mitentstandene l-Sparteïn nach chromatographischer Adsorption an Al_2O_3 mit Petroläther eluiert war, schied sich aus dem anschließenden Äthereluat (das 1% Azeton enthielt) das l- α -Isosparteïn kristallin aus. Schmp. 73–75° (Hydrat). Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{28} = -55,6^\circ$ (aus Methanol).

Der Mischschmelzpunkt mit reinem l- α -Isosparteïn gab keine Depression. Damit ist bewiesen, daß Base „A“ identisch mit d- α -Isolupanin ist. In den Samen der blauen Lupine sind demnach folgende Alkaloide enthalten: d-Lupanin, Oxylypanin und d- α -Isolupanin.

Beschreibung der Versuche

Als Ausgangsmaterial stand uns ein Extrakt aus 50 kg reifer Samen der blauen Lupine zur Verfügung, der in der Weise gewonnen war, daß man den zerkleinerten Samen erst mehrere Tage in Methanol digerierte und dann anschließend mit heißem Methanol extrahierte. Der Extrakt, zur Syrupkonsistenz eingedampft, enthielt noch erhebliche Anteile Fett und Eiweiß. Er mischte sich nur unvollkommen, sowohl mit kaltem Wasser als auch mit verdünnter Salzsäure. Versuche, die störenden Eiweißmengen durch Behandeln mit Bleiazetat oder durch Erhitzen mit Sörensen's Reagens zu entfernen, schlugen fehl. Daher wurde der Extrakt mit der dreifachen Menge 4%iger wäßriger Salzsäure versetzt und 2 Stunden lang unter ständigem Rühren erhitzt. Dabei hydrolysierten die Eiweißstoffe. Beim Erkalten schied sich auf der dunkelbraunen salzsauren Lösung eine reichliche Fettschicht ab. Diese wurde abgetrennt und zur Entfernung etwa eingeschlossener Alkaloidanteile einige Male mit heißer 6%iger Salzsäure ausgezogen.

Ausschüttelung des salzsauren wäßrigen Anteils mit Chloroform

Die salzsauren Auszüge wurden mehrfach mit Chloroform extrahiert, die vereinigten Chloroformanteile über entwässertem Natriumsulfat getrocknet und dann vom Lösungsmittel befreit. Die im Extrakt verbliebenen Chloroformanteile ließen sich nach Zusatz von Methanol durch Destillation als azeotropes Gemisch ($K_p = 53,5^\circ$) entfernen. Es hinterblieben 76,4 g eines zähen Extraktes.

Ausschüttelung der alkalisch-wäßrigen Anteile mit Äther

Wegen der starken Wasserlöslichkeit der Lupinenalkaloide wurden die sauren wäßrigen Anteile der Chloroformausschüttelung neutralisiert und bis zur zähflüssigen Konsistenz eingeeengt. Dann wurde mit 40%iger Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und 10mal mit je 1 Liter Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge wurden über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad vom Lösungsmittel befreit. Es hinterblieb ein gelbroter, grünfluoreszierender Rückstand (102 g) von honigartiger Konsistenz und schierlingartigem Geruch. Er war in Wasser fast klar löslich.

Ausschüttelung der alkalisch-wäßrigen Lösung mit Chloroform

Anschließend wurde die alkalisch-wäßrige Phase 10mal mit je 750 g Chloroform extrahiert. Die schon bei der Ätherausschüttelung sich störend bemerkbar machende Emulsionsbildung war jetzt so stark, daß trotz vorsichtigen Schüttelns die Trennung der Phasen selbst bei Zusatz von einigen cem Oktylalkohol bis zu einer Stunde dauerte. Es hinterblieb ein harzartiger Rohalkaloidrückstand (32,8 g).

Reinigung der mit Chloroform ausschüttelbaren Alkaloidanteile

Da sowohl die aus saurer, als auch aus alkalischer Phase mit Chloroform ausschüttelbaren Anteile noch sehr unrein waren, wurden sie mit 6%iger wäßriger Salzsäure digeriert. Nur knapp $\frac{2}{3}$ des Abdampfrückstandes gingen dabei in Lösung. Zurück blieb eine schwarzbraune, schmierige Masse, die aus Fett und Harzstoffen bestand. Die salzsaure Lösung wurde dann stark alkalisch gemacht und erschöpfend mit Äther und anschließend mit Chloroform geschüttelt. Nach dem Abdampfen des Äthers verblieb ein Alkaloidrückstand von 34,5 g, die Chloroformlösung lieferte 1,2 g.

Die Gesamtmenge an Rohalkaloiden betrug 170,5 g. Diese entspricht einem Alkaloidgehalt der Samen von 0,35%. Nach Siebert⁵⁾ „ungefähr 0,35%“, nach Hagen⁶⁾ 0,19 bis 0,22%.

Papierchromatographische Untersuchung der Alkaloidfraktionen

1. Eindimensionale aufsteigende Chromatographie

Von den verschiedenen Fraktionen wurden 1%ige wäßrige Lösungen hergestellt und, falls keine klare Lösung eintrat, diese mit n/10-Salzsäure schwach angesäuert.

Arbeitsweise: Als Entwicklungskammer dienten große Glaskästen. Es wurde eindimensional auf Papier 2043b von Schleicher & Schüll gearbeitet.

Lösungsmittel: n-Butanol-Salzsäure-(37%ig)-Wasser (100-15-Sättigung). Es wurde bis zu einer Höhe von 25 cm aufsteigend chromatographiert, wozu 13 Stunden benötigt wurden. Zur Sichtbarmachung diente modifiziertes Dragendorff-Reagens⁷⁾.

Auswertung der Chromatogramme

In allen Fraktionen waren 2 Alkaloide nachweisbar, deren R_f -Werte mit Lupanin und Oxylypanin übereinstimmten.

Absteigende Chromatographie

Papier 2043b mit n/5-KCl-Lösung vorbehandelt.

Lösungsmittel: Butanol-Salzsäure-Wasser.

Aufgetragene Menge 50 γ .

Es wurden wieder zwei Flecke erhalten. Der Lupaninfleck war noch weiter auseinander gezogen.

Absteigendes Durchlaufchromatogramm

Verfahren wie bei der absteigenden Methode, nur war die untere Kante des Bogens ausgezackt. Es waren 3 Flecke zu erkennen. Der zweite Fleck war von dem Lupaninfleck noch nicht völlig getrennt, doch unterschied sich sein Zentrum deutlich von dem des Lupanins.

Zweidimensionale Chromatographie

Lösungsmittel:

1. Butanol-Salzsäure-Wasser (100-10-Sättigung).

2. Butylazetat-Butanol-Eisessig-Wasser (47-9-28-16).

Papier 2043b gesalzen mit n/5 KCl.

Die Trennung gelang am besten, wenn wir mit dem absteigenden Durchlaufchromatogramm begannen und danach bis zum Verschwinden des HCl-Geruches den Bogen trockneten. Als dann drehten wir ihn um 90° und schlossen mit dem Lösungsmittelgemisch 2 nach 3stündiger Sättigung die zweite Chromatographie an. Drei deutlich voneinander getrennte Flecken waren sichtbar.

⁵⁾ C. Siebert, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 229, 531 (1891).

⁶⁾ H. Hagen, Inauguraldissertation Halle/S. (1885).

⁷⁾ Munier und Macheboeuf, Bull. Soc. Chim. biol. 32, 192 (1950).

Trennung des Alkaloidgemisches durch Hochvakuumdestillation

12 g der Rohbase wurden bei 7×10^{-3} torr der Destillation unterworfen. 3 Fraktionen wurden aufgefangen.

Fraktion	Ausbeute	Badtemperatur	Siedetemperatur
Fraktion I	5,1 g	160—190°	147—157°
Fraktion II	1,5 g	215°	185—195°
Fraktion III	1,7 g	250°	210°

Alle 3 Fraktionen bildeten ein hellgelbes, zähflüssiges Öl, etwa 3,5 g blieben als verkohlter Rückstand im Destillierkolben. Die 3 Fraktionen wurden aufsteigend mit Butanol-Salzsäure-Gemisch auf KCl behandeltem Papier chromatographiert.

Fraktion I: zeigte geschwänztes Lupanin an.

Fraktion II: Lupanin (geschwänzt) und wenig Oxy-lupanin.

Fraktion III: Lupanin (geschwänzt) und Oxy-lupanin zu gleichen Teilen.

Abtrennung des Lupanins aus dem Basengemisch über die Bitartrate

Die vereinigten Fraktionen I und II wurden in Wasser gelöst und mit 30%iger Weinsäurelösung bis zum $p_H = 3$ versetzt. Es trat sofort Kristallbildung ein. Nach 6 Stunden trennten wir die Kristalle ab. Beim Einengen der Mutterlauge schieden sich weitere Kristalle ab. Auf diese Weise konnte in 8 Fraktionen Lupanin als Bitartrat abgetrennt werden. Schmp. 193—194° (aus heißem Wasser).

Hochvakuumdestillation der vom Lupanin befreiten Alkaloidmutterlaugen

Zu diesem Zweck wurde das Basengemisch alkalisch mit Chloroform ausgeschüttelt. Der Rückstand wurde in der Apparatur nach Jantzen (Kupferkasten) bei 10^{-2} torr der Destillation unterworfen.

Fraktion	Ausbeute	Temperatur im Luftkasten
Fraktion I	0,15 g	Vorlauf
Fraktion II	0,91 g	123—126°
Fraktion III	0,59 g	130—135°

Chromatogramm der einzelnen Fraktionen

Aufsteigend mit Butanol-Salzsäure-Gemisch auf KCl-Papier.

Fraktion I: Neue Base A mit etwas Lupanin.

Fraktion II: Base A $R_f = 0,46$.

Fraktion III: Base A, Lupanin und wenig Oxy-lupanin.

Überführung der Fraktion II in Perchlorat

Fraktion II (0,7 g Base) wurde in wenig Isopropanol gelöst und mit einer Lösung von Isopropanol-Perchlorsäure (1 + 1) bis zum $p_H = 7,5$ versetzt. Nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank und nach häufigerem Reiben mit einem Glasstab bildeten sich langgestreckte prismatische Kristalle. Schmp.: 239—240° (aus Isopropanol-Azeton).

d-Lupanin-perchlorat: Schmp. 212°.

Isolierung der Base A

540 mg Perchlorat wurden in 3 ccm heißem Wasser gelöst und 9mal mit 6 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen und Entfernen des Lösungsmittels blieben büschelige, glasige Kristalle zurück, an denen noch Spuren von gelbem Öl haften. Sie wurden in Petrolbenzin gelöst und vorsichtig mit einem Tropfen Wasser versetzt. Der Wassertropfen

war stark gelb gefärbt und hatte die letzten Spuren von hartnäckig anhaftendem Lupanin aufgenommen (papierchromatographisch identifiziert).

Die Petrolbenzinlösung wurde abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Es schieden sich farblose, plättchenförmige Kristalle ab.

Schmp. 75,7—76°.

Spezifische Drehung aus Wasser:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = +39,1^{\circ} \quad (c = 1,6).$$

Spezifische Drehung aus Äthanol (absolut):

$$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +65,88 \quad (c = 3,4).$$

Die Kristalle färbten sich an der Luft schnell braun, sie wurden deshalb sofort in 6%iger Salzsäure gelöst.

Darstellung von Dehydrolupanin (Merkuriazetat)

1 g kristallisiertes d-Lupanin wurde nach A. Kneuer¹⁾, L. Marion und N. J. Leonard⁸⁾ mit Merkuriazetat dehydriert. Abgeschieden: 2,16 g Merkuroazetat (berechnet für 2 Wasserstoffatome 2,08 g Merkuroazetat).

Papierchromatographische Untersuchung des Dehydrolupanins

Butanol-Salzsäure-Methode: Dehydrolupanin (Merkuriazetat)

zeigt einen starken Fleck R_f 0,32

und einen schwachen Fleck R_f 0,17.

Rehydrierung des Dehydroproduktes zu d- α -Isolupanin

0,5 g der rotbraunen Dehydrobase wurden in 20 ccm absolutem Äthanol mit 0,1 g Platinoxid hydriert. Das Hydrierungsprodukt war ein hellgelbes Öl.

Papierchromatographische Untersuchung des Rehydrierungsproduktes

Butanol-Salzsäure-Methode.

Das Chromatogramm zeigte einen starken Fleck: α -Isolupanin (er lag in gleicher Höhe wie die aus der Pflanze isolierte Base A); außerdem waren noch Spuren des Dehydroproduktes zu erkennen.

Säulenchromatographische Trennung des Hydrierungsproduktes

Das Hydrierungsprodukt wurde in 5 ccm Petroläther gelöst und auf eine Aluminiumoxydsäule (20 g Al_2O_3 , Aktivitätsstufe II) aufgetropft. Eluiert wurde zuerst mit 100 ccm Petroläther und anschließend mit 200 ccm Äther.

Das Petroläthereluat enthielt 0,08 g eines hellgelben Öles, das sich im Papierchromatogramm als 1-Sparte in zu erkennen gab.

Das Äthereluat hinterließ nach dem Abdunsten des Lösungsmittels 0,19 g eines hellgelben Öles, das vom Rande her kristallin erstarrte. Schmp. 73—75°.

Mischschmelzpunkt mit α -Isosparte in-Hydrat ohne Depression.

Spezifische Drehung des Äthereluates:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -55,6^{\circ} \quad (\text{aus Methanol}) \quad (c = 1,24).$$

Aufarbeitung der aus alkalischer Lösung mit Chloroform ausschüttelbaren Fraktion

Hochvakuumdestillation:

Die Ausschüttelungsfraktion „Alkalisch Chloroform“ wurde bei einem Druck von 5×10^{-3} torr destilliert. Das Basengemisch konnte in 2 Fraktionen aufgetrennt werden:

⁸⁾ L. Marion und J. N. Leonard, *Canad. J. Chem.* 29, 355 (1951).

Ölbad 220—230°	Kp. 130—140°	Ausbeute 1,2 g
Metallbad 300—330°	Kp. 205—220°	Ausbeute 12,5 g

Fraktion Kp 130—140° war ein hellgelbes Öl, das im Chromatogramm als Lupanin identifiziert wurde. Die hochsiedende Fraktion war ein hellgelbes Harz, das an den kälteren Stellen der Apparatur sofort bernsteinartig erstarrte und sich im Chromatogramm als Oxyloganin erwies.

Anschrift: Prof. Dr. K. Winterfeld, Dir. des Pharmaz. Instituts der Universität Bonn, Bonn, Kreuzbergweg 26.

1619. K. W. Merz und H. Lehmann

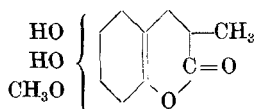
Zur Kenntnis des Loganins

2. Mitteilung^{*)}

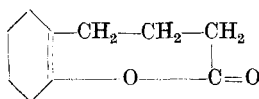
Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Freiburg/Br.

(Eingegangen am 3. Juni 1957)

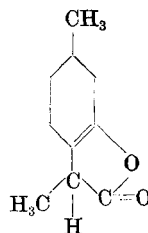
Das von W. R. Dunstan und F. W. Short¹⁾ im Fruchtmus von *Strychnos nuxvomica* (Loganiaceae) entdeckte Glycosid Loganin ist nach L. Rosenthaler²⁾ identisch mit dem von M. Bridel³⁾ im Bitterklee aufgefundenen Glycosid „Meliatin“. K. W. Merz und K. G. Krebs⁴⁾ stellten zwei mögliche Teilformeln (I und II) des Genins zur Diskussion, die mit ihren Befunden nicht im Widerspruch standen. Möglich schien damals auch die Partialformel (III)⁵⁾, die an Hand der Isoprenregel⁶⁾ aufgestellt worden war.



I.



II.



III.

In einer 1951 erschienenen Arbeit untersuchte Fr. Jaminet⁷⁾ das papierchromatographische Verhalten von Auszügen aus verschiedenen *Strychnos*-arten. Er fand dabei in den einzelnen Drogen bis zu drei Substanzen, die sich im R_f -Wert unterschieden, jedoch die gleiche Farbreaktion gaben wie das Loganin. Bemerkenswert ist, daß auch die

^{*)} 1. Mitteilung: K. W. Merz und K. G. Krebs s. ⁴⁾

¹⁾ W. R. Dunstan und F. W. Short, Pharm. J. and Trans. XIV. 3, 1025 (1883/84).

²⁾ L. Rosenthaler, Schweiz. Apotheker Ztg. 61, Nr. 31 (1923).

³⁾ M. Bridel, J. Pharmac. Chim. VIII. 4, 49 (1911).

⁴⁾ K. W. Merz und K. G. Krebs, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 275/47, 217 (1937).

⁵⁾ K. W. Merz, Schriften der Königsberger Gelehrten Gesellschaft 17, 54 (1941).

⁶⁾ Vgl. Ruzicka, Angew. Chem. 51, 5 (1938).

⁷⁾ Lejeunia, Rev. Bot. 15, 23—28 (1951).