

Vorstufen cyclischer Polysulfide in den Samen von *Parkia speciosa* Hassk.

Precursors of Cyclic Polysulphides in Seeds of *Parkia speciosa* Hassk.

Rudy Susilo und Rolf Gmelin

Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin,
Königin-Luise Str. 2-4, D-1 Berlin 33, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **37c**, 584 – 586 (1982); eingegangen am 5. März 1982

Parkia speciosa, Mimosaceae, Non-Protein Amino Acids, Precursors of Cyclic Polysulphides

Two sulphur containing amino acids, dichrostachinic acid and djenkolic acid, and one sulphur containing imino acid, thiazolidine-4-carboxylic acid, have been isolated from the seeds of *Parkia speciosa* Hassk. Dichrostachinic acid and djenkolic acid have been established as precursors of cyclic polysulphides in *Parkia speciosa* Hassk.

Wir berichteten kürzlich über die Isolierung und Strukturaufklärung der cyclischen Polysulfide, die nach enzymatischer Spaltung aus den Samen von *Parkia speciosa* Hassk. isoliert werden konnten [1]. Ihre massenspektroskopischen und NMR-spektroskopischen Eigenschaften wurden beschrieben [2, 3].

Parkia speciosa Hassk. gehört zu der Pflanzenfamilie Mimosaceae. Ihre Samen werden in Indonesien unter der Bezeichnung „Petai“- oder „Pete“-Bohnen als Nahrungsmittel und als Volksheilmittel gegen Harnwegsinfekte verwendet. Die antibiotischen Eigenschaften solcher cyclischen Polysulfide gegen verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien und gegen einige Pilze konnten *in vitro* bestätigt werden [1, 4].

Als Vorstufen solcher cyclischen Polysulfide wurden bisher Lentinsäure aus dem japanischen Shiitake-Pilz *Lentinus edodes* [7] und deren Epimer Epilentinsäure aus den Pilzen verschiedener Micromphale- und Collybia-Arten [5] isoliert. Hier wird über neue Vorstufen cyclischer Polysulfide aus den Samen von *Parkia speciosa* Hassk. berichtet.

Ergebnisse und Diskussion

Voruntersuchungen ergaben, daß die durch Sephadex G-25 grob gereinigten wäßrigen Extrakte der *Parkia*-Samen Methyl-, Äthyl-L-Cystein und deren Sulfoxide spalten.

Diese Befunde deuten auf das Vorhandensein eines Enzyms vom CS-Lyase-Typ, das substratspe-

zifisch für S-Alkyl-L-Cysteine und S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide sein kann. Demnach müssen die Vorstufen der obengenannten cyclischen Polysulfide aus *Parkia speciosa* Hassk. unter Derivaten von S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden zu suchen sein.

Dünnschichtchromatographie eines Äthanolextraktes aus *Parkia*-Samen zeigte 3 Hauptflecken, die mit Ninhydrin- und Kaliumhexajodoplatinat-Reagenz positiv reagierten. (R_f -Werte in Fließmittel C, Sprühreagenz Ninhydrin; **1**, R_f 0,48 (bläuviolett), **2**, R_f 0,27 (violett), **3**, R_f 0,05 (lachsrot).) Dünnschichtelektrophorese in 0,3 M Phosphat-Puffer bei pH 5,5 wandert **1** etwas weiter zur Anode im Vergleich zu **3**, das wie neutrale Vergleichssubstanzen wandert. **2** bewegt sich dagegen etwas langsamer als L-Glutaminsäure zur Anode hin. Die Isolierung der Substanzen **1**, **2** und **3** erfolgte in üblicher Weise durch Ionenaustauscher-Chromatographie. Substanz **1** konnte als Thiazolidin-4-carbonsäure identifiziert werden. Die Eigenschaften der isolierten Substanz stimmten mit einem synthetisierten Präparat [8] überein. Aufgrund ihrer Struktur kommt diese Verbindung nicht als Vorstufe der cyclischen Polysulfide in Frage. Substanz **2** erwies sich als identisch mit Dichrostachinsäure, die erstmals aus *Dichrostachys glomerata* [6] isoliert wurde. Als Vergleich wurde Dichrostachinsäure aus *Dichrostachys glomerata* isoliert. Die IR- und NMR-Daten sowie die Schmelzintervalle der beiden Verbindungen stimmten überein. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Vergleicht man jedoch die Werte der optischen Drehung von Dichrostachinsäure aus *Dichrostachys glomerata* und Dichrostachinsäure aus *Parkia speciosa* mit dem von Gmelin [6] angegebenen Wert, so stellt man beträchtliche Abweichungen

der Werte fest. (*Parkia speciosa*: $[\alpha]_D^{23} = +0,75^\circ$, 1 N HCl, $c = 2,0$; *Dichrostachys glomerata*: $[\alpha]_D^{23} = +3,55$, 1 N HCl, $c = 2,0$ (eigene Isolierung); $[\alpha]_D^{24} = +6,70$, 1 N HCl, $c = 2,3$ [6]).

Wir vermuteten, daß die aus *Parkia*-Samen und aus *Dichrostachys*-Samen isolierte Dichrostachinsäure durch eine optisch aktive Substanz verunreinigt war. Die beiden Präparate wurden deshalb mehrmals umkristallisiert. Sie zeigten jedoch eine gleichbleibende optische Drehung. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten wäre, daß eine Racemisierung während des Isolierungsvorganges stattgefunden hat, was noch zu klären ist. Substanz 3 wurde aus den neutralen und basischen Verbindungen enthaltenden Fraktionen isoliert. Die Daten von Substanz 3 entsprechen in allen Eigenschaften synthetischer L-Djenkolsäure.

Da L-Djenkolsäure durch Hydrolyse unter Bildung eines Halbmercaptals und anschließende Cyclisierung sehr leicht Thiazolidin-4-carbonsäure bilden kann, ist es wahrscheinlich, daß Substanz 1 (Thiazolidin-4-carbonsäure) ein Artefakt ist.

Zur Prüfung, ob die isolierten schwefelhaltigen Aminosäuren tatsächlich die Vorstufen der cyclischen Polysulfide sind, wurden die aus *Parkia speciosa* isolierte L-Djenkolsäure und die Dichrostachinsäure mit lyophilisierter *Parkia*-CS-Lyase (Publikation in Vorbereitung) je 2 Std. lang in 0,1 M Tris-Puffer pH 8,2 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit CHCl_3 extrahiert. Der Rohextrakt der organischen Phase wurde auf einer Kieselgel-Säule mit *n*-Hexan als Fließmittel getrennt. Die enzymatische L-Djenkolsäure-Spaltung ergab 1.2.4-Trithiolan und 1.2.4.6-Tetrathiepan. Bei der Dichrostachinsäure-Spaltung war dagegen lediglich 1.2.4.6-Tetrathiepan nachzuweisen. Die Identifizierung erfolgte durch MS- und NMR-Messungen und durch Vergleich mit den authentischen Substanzen.

Während aus den *Parkia*-Samen selbst fünf cyclische Polysulfide isoliert werden konnten [1], wurden hier nur 2 verschiedene Verbindungen identifiziert. Der Grund dafür dürfte in erster Linie in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu suchen sein, da beim Abbau in den Samen andere natürliche Bedingungen herrschen können als beim Abbau der isolierten Precursors *in vitro*. Weiterhin konnten in MS-Untersuchungen der cyclischen Polysulfide [3] gezeigt werden, daß gerade diese beiden Verbindungen die stabileren Formen sind, die oft durch

Ringkontraktion bzw. Ringspaltung und Umlagerung aus anderen cyclischen Polysulfiden gebildet werden.

Experimentelles

$^1\text{H-NMR}$: Bruker WH 270; Schmelzpunkte: Kofler-Heiztisch-Mikroskop, 4°C/min , nicht korrigiert; Optische Drehung: Perkin-Elmer-141-Polarimeter.

Chromatographie und Elektrophorese

Für die DC wurden DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} von Merck und DC-Folien Polygram Sil G-UV₂₅₄ von Macherey und Nagel verwendet. Als Fließmittel wurden verwendet: *n*-Butanol-Eisessig-Wasser, 4:1:2 (A); Phenol-Wasser, 7:3 (B); Isopropanol-Ammoniaklösung (5%), 7:3 (C). Zur DS-Elektrophorese wurden Folien Polygram Cel₃₀₀ und Polygram Sil G-UV₂₅₄ der Fa. Macherey und Nagel bzw. Fertigplatten von Merck mit Kieselgel 60 $\text{F}_{254,366}$ verwendet. Die Elektrophorese wurde in 0,3 M Phosphat-Puffer, pH 5,5 bei 900 V und verschiedenen Laufzeiten durchgeführt. Zur Detektion nach der Entwicklung der Chromatogramme und der Elektropherogramme wurden Ninhydrin-Reagenz (0,2-prozentige Lösung in Aceton) und K-Jodplatinat-Reagenz (0,1% in H_2O) verwendet.

Extraktion und Isolierung

400 g tiefgefrorene, im Handel erhältliche *Parkia*-Samen wurden in siedendem Methanol 5 min lang aufgekocht, zerkleinert und zweimal mit je 1 l 50-prozentigem Methanol extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittel in Vakuum wurde der Rohextrakt in 1 l Wasser gelöst, filtriert und auf eine Säule mit Lewatit MP 5080 (1,5 cm \times 40 cm, Acetatform) aufgetragen. Der Durchlauf wurde aufbewahrt. Die Säule wurde mit 7-prozentiger CH_3COOH -Lösung eluiert. Die weitere Trennung erfolgte auf einer Säule mit Sephadex DEAE A-25 (2 cm \times 50 cm, Acetatform). Die Elution erfolgte mit einem Essigsäure-Gradienten (0,5–4%, a 300 ml; Fraktionen 12 ml/12 min).

Thiazolidin-4-carbonsäure (1, Fraktionen 35–40, Ausbeute = 40 mg): R_f 0,21 (A), 0,35 (B), 0,48 (C); Schmp. $196^\circ\text{--}197^\circ\text{C}$; El. analyse ergab C 36,08%, H 5,57%, N 10,55%, S 24,65% (berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$: C 36,08%, H 5,29%, N 10,51%, S 24,07%). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , δ -Skala in ppm, δ -Werte bezogen

auf TMS): $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-)$, $\delta = 3,19$ (dd, $J = 12, 6$ Hz, 1 H), $\delta = 3,29$ (dd, $J = 12, 7$ Hz, 1 H); $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-)$, $\delta = 4,29$ (dd, $J = 6, 7$ Hz, 1 H); $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{ND}_2^-)$, $\delta = 4,27, 4,39$ ($J_{\text{AB}} = 10$ Hz, 2 H).

(\pm) *Dichrostachinsäure* (**2**, Fraktionen 84–97, Ausbeute = 420 mg): R_f 0,06 (A), 0,05 (B), 0,27 (C); Schmp. $200^\circ - 201^\circ \text{C}$; El. analyse: C 28,65%, H 4,61%, N 4,78%, S 22,20% (berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_7\text{S}_2$: C 29,26%, H 4,57%, N 4,88%, S 22,25%); opt. Drehung $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +0,75^\circ$ (1 N HCl, $c = 2,0$). ^1H -NMR (D_2O , δ in ppm, TMS): $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-)$, $\delta = 3,17$ (dd, $J = 14,6, 4$ Hz, 1 H), $\delta = 3,29$ (dd, $J = 14,6, 7,7$ Hz, 1 H); $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{ND}_2^-)$, $\delta = 3,93$ (dd, $J = 4, 7,7$ Hz, 1 H); $(-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OD})-\text{COO}^-)$, $\delta = 3,68$ (dd, $J = 14,6, 12$ Hz, 1 H), $\delta = 3,68$ (dd, $J = 14,6, 0$ Hz, 1 H), $(-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OD})-\text{COO}^-)$, $\delta = 4,55$ (dd, $J =$

12, 0 Hz, 1 H); $(-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{S}-)$, $\delta = 4,28, 4,23$ ($J_{\text{AB}} = 16$ Hz, 2 H).

L-Djenkolsäure (**3**, Ausbeute = 650 mg). Zur Weiterverarbeitung wurde der Durchlauf auf 100 ml eingengt und auf pH 7,0 eingestellt. Er wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Das ausgefallene Präzipitat wurde abgesaugt, gewaschen und umkristallisiert. Auf diese Weise konnte *L-Djenkolsäure* rein erhalten werden. R_f 0,03 (A), 0,07 (B), 0,05 (C); Schmp. ab 224°C , Zersetzung; El. analyse: C 33,36%, H 5,81%, N 11,04%, S 24,24% (berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: C 33,06%, H 5,54%, N 11,01%, S 25,21%). ^1H -NMR (D_2O , δ in ppm, TMS): $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-)$, A_2 -System, $\delta = 3,66$ (2 H), $2 \times (-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{ND}_2^-)-\text{COO}^-)$, $\delta = 3,03$ (dd, $J = 14, 3$ Hz, 2 H), $\delta = 3,09$ (dd, $J = 14, 8,7$ Hz, 2 H); $(-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{ND}_2^-)-\text{COO}^-)$, $\delta = 3,82$ (dd, $J = 3, 8,7$ Hz, 2 H).

- [1] R. Gmelin, R. Susilo und G. R. Fenwick, *Phytochemistry* **20**, 2521 (1981).
- [2] R. Susilo, R. Gmelin, K. Roth u. H. Bauer, *Z. Naturforsch.* **37 b**, 234 (1982).
- [3] G. Holzmann, R. Susilo u. R. Gmelin, *Org. Mass. Spectrom.* im Druck.
- [4] K. Morita u. S. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **15**, 988 (1967).
- [5] R. Gmelin, M. N'Galamulume-Treves u. G. Höfle, *Phytochemistry* **19**, 553 (1980).
- [6] R. Gmelin, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **327**, 186 (1962).
- [7] K. Yasumoto, K. Iwami u. H. Mitsuda, *Agr. Biol. Chem.* **35**, 2059 (1971).
- [8] S. Ratner und H. T. Clarke, *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 200 (1937).