

Alkaloide aus Rhamnaceen, XXII¹⁾

Amphibin-I, ein neues Alkaloid aus *Ziziphus amphibia* A. Cheval.

Rudolf Tschesche*, Christian Spilles und Gert Eckhardt

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,
D-5300 Bonn, Max-Planck-Straße

Eingegangen am 24. Dezember 1973

Aus dem Rohbasengemisch von *Ziziphus amphibia* A. Cheval., in dem bisher nur Cyclopeptidalkaloide gefunden wurden²⁻⁴⁾, konnte das Aporphinalkaloid (–)-Nuciferin⁵⁾ (1) und Amphibin-I (2) isoliert werden. 2 hat die Struktur eines 6,7-Dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolins mit einer Peptidseitenkette an C-1, wie durch chemischen Abbau und spektroskopische Methoden bewiesen werden konnte.

Alkaloids from Rhamnaceae, XXII¹⁾

Amphibine-I, a new Alkaloid from *Ziziphus amphibia* A. Cheval.

Amphibine-I (2) and the aporphine alkaloid (–)-Nuciferine⁵⁾ (1) have been isolated from the crude alkaloid extract of *Ziziphus amphibia* A. Cheval., in which previously only cyclopeptide alkaloids had been found²⁻⁴⁾. The structure of 2 was elucidated by spectroscopic and degradative methods as 6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline with a peptide side chain at C-1.

In früheren Mitteilungen²⁻⁴⁾ haben wir die Isolierung und Strukturaufklärung der in der Rinde von *Ziziphus amphibia* vorkommenden Peptidalkaloide Amphibin-A bis -H beschrieben. Durch weitere chromatographische Auftrennung des nach der Benzol-Ammoniak-Methode⁴⁾ erhaltenen Rohbasengemisches konnten das Aporphinalkaloid (–)-Nuciferin⁵⁾ (1) sowie ein neues Alkaloid Amphibin-I (2) isoliert werden. 2 gehört einem bisher nicht bekannten Strukturtyp an und weist ein 6,7-Dimethoxy-2-methyl-tetrahydroisochinolinsystem auf, welches an C-1 einen mit Valylglycin amidartig verknüpften α -Aminoäthylrest trägt. In neueren Arbeiten wurde über das Vorkommen von Tetrahydroisochinolinen in cyclopeptidalkaloid-haltigen Pflanzen berichtet⁶⁻⁸⁾. Amphibin-I, das Strukturmerkmale beider Alkaloidtypen aufweist, deutet auf einen möglichen biogenetischen Zusammenhang dieser Verbindungen hin.

1) XXI. Mittel.: R. Tschesche, I. Khokkar, C. Spilles und M. v. Radloff, *Phytochemistry*, im Druck.

2) R. Tschesche, E. U. Kaufmann und H.-W. Fehlhaber, *Tetrahedron Lett.* 1972, 865.

3) R. Tschesche, E. U. Kaufmann und H.-W. Fehlhaber, *Chem. Ber.* 105, 3094 (1972).

4) R. Tschesche, C. Spilles und G. Eckhardt, *Chem. Ber.* 107, 686 (1974).

5) H. R. Arthur und H. T. Cheung, *J. Chem. Soc.* 1959, 2306.

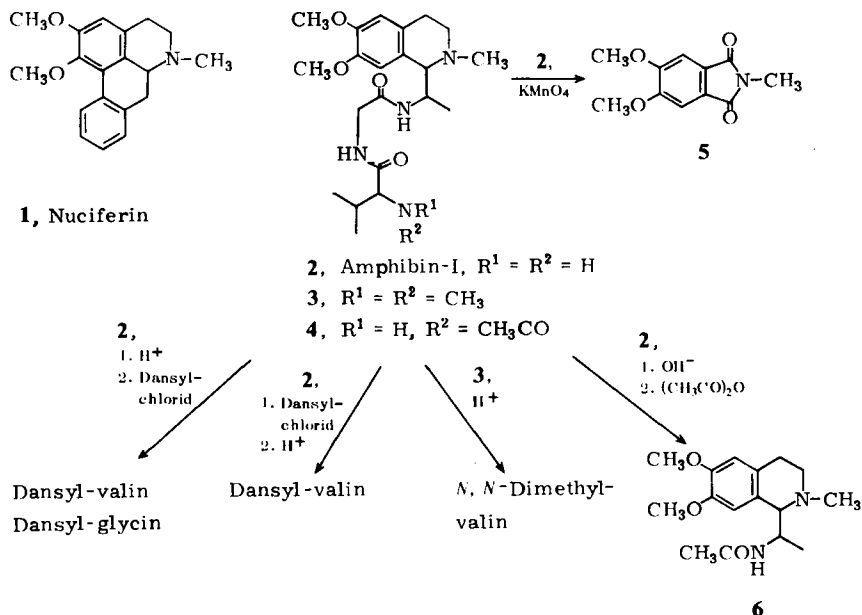
6) M. Pailer und E. Haslinger, *Monatsh. Chem.* 103, 1399 (1972).

7) D. W. Bishay, Z. Kowalewski und J. D. Philipson, *Phytochemistry* 12, 693 (1973).

8) P. Pacheco, S. M. Albonico und M. Silva, *Phytochemistry* 12, 954 (1973).

Aus der stark polaren Fraktion des Rohbasengemisches wurde durch mehrfache Chromatographie an Kieselgel **2** in amorpher Form mit einer Ausbeute von etwa 0.001 % (bezogen auf trockene Droge) erhalten und als Dihydrochlorid bzw. Tetramethyldijodid kristallisiert. Die Summenformel von **2** wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu $C_{21}H_{34}N_4O_4$ ermittelt. *N*-Methylierung nach *Bowmann*⁹⁾ ergab *N,N*-Dimethylamphibin-I (**3**), Acetylierung *N*-Acetylamphibin-I (**4**).

Schema 1

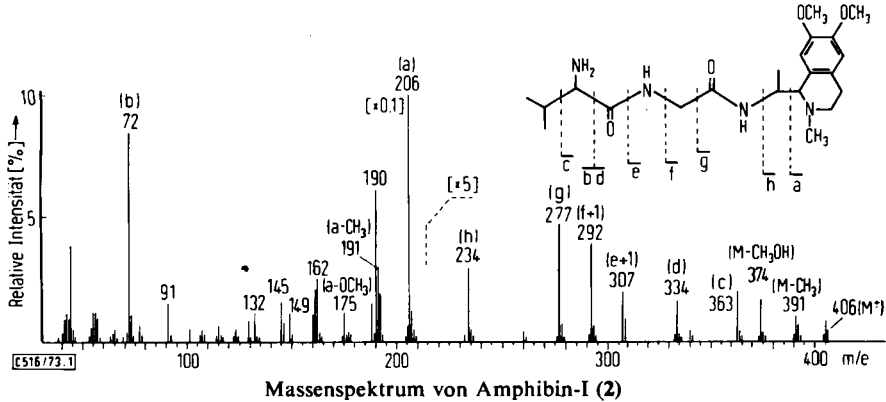


Das IR-Spektrum von **2** zeigt typische Banden für sekundäre Amide (3340 und 1655 cm^{-1}), *O*-Methyl- (2820) und *N*-Methylgruppen (2780) sowie Phenoläther (1240). Im UV-Spektrum erkennt man eine starke Bande bei 282 nm, die nach Lage und Intensität mit der für 1-Alkyl-6,7-dimethoxy-2-methyl-tetrahydroisochinoline beobachteten Absorption übereinstimmt¹⁰⁾. Im 1H -NMR-Spektrum von **2** erscheinen bei $\delta = 0.82$ und 0.96 ppm die Dubletts ($J = 7$ Hz) der Methylgruppen des endständigen Valins, bei $\delta = 1.05$ ppm das Dublett ($J = 6.5$ Hz) der Methylgruppe des an C-1 gebundenen substituierten Äthylrestes. Die Singulets der *N*-Methyl- sowie der *O*-Methylgruppen liegen bei $\delta = 2.54$ bzw. 3.82 und 3.85 ppm. Das Proton an C-1 liefert ein Dublett ($J = 8$ Hz) bei $\delta = 4.1$ ppm, die Aromatenprotonen scharfe Singulets bei $\delta = 6.56$ und 6.61 ppm. Die Protonen am basischen Stickstoff geben ein verbreitertes Singulett bei $\delta = 1.64$ ppm. Das Amidproton der Glycineinheit erscheint durch Kopplung mit den Wasserstoffatomen der benachbarten Methylengruppe als Triplett ($J = 5$ Hz) bei $\delta = 7.9$ ppm, das andere Amidproton als Dublett ($J = 6$ Hz) bei $\delta = 7.1$ ppm. Im 1H -NMR-Spektrum von **3** wird bei $\delta = 2.24$ ppm ein Singulett für die *N,N*-Dimethylaminogruppe, im Spektrum von **4** bei $\delta = 2.0$ ppm ein Singulett für die *N*-Acetylgruppe beobachtet.

⁹⁾ R. E. *Bowmann*, J. Chem. Soc. **1950**, 1342.

¹⁰⁾ M. *Shamma*, The Isoquinoline Alkaloids, Academic Press, New York and London 1972.

Beim massenspektrometrischen Zerfall von **2** (Abbild.) werden durch α -Spaltungen am ring-¹¹) bzw. endständigen Stickstoffatom bevorzugt die Ionen **a** bzw. **b** gebildet. Im Falle von **3** ist das Fragment **b** nach m/e 100, im Falle von **4** nach m/e 114 verschoben. Der stufenweise Abbau der Peptidkette liefert die Ionen **c** bis **h**. Die Elementarzusammensetzung aller Fragmente wurde mittels Hochofauflösung bestimmt.



Zum Nachweis der Bausteine des Moleküls wurde **2** einer sauren Hydrolyse unterworfen. Nach Umsetzung des Hydrolysats mit Dansylchlorid¹²⁾ ließen sich durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Kieselgel Dansyl-valin und -glycin identifizieren. Zum Nachweis der terminalen Aminosäure wurde **2** zuerst mit Dansylchlorid umgesetzt und anschließend hydrolysiert, wobei nur Dansyl-valin erhalten wurde. In Übereinstimmung damit lieferte **3** nach saurer Spaltung *N,N*-Dimethylvalin. Alkalische Hydrolyse von **2** und Acetylierung des Reaktionsproduktes ergab **6**, dessen Struktur spektroskopisch gesichert wurde. Bei der Permanganatoxidation entstand das Phthalimid **5**, das von *Djerassi* als Oxidationsprodukt eines 1-Isobutyl-6,7-dimethoxy-2-methyl-tetrahydroisochinolins bereits beschrieben wurde¹³⁾.

Wir danken der *Stiftung Volkswagenwerk* für die zur Anschaffung des Massenspektrometers bereitgestellten Mittel, sowie der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Bereitstellung des 90-MHz-Kernresonanzspektrometers und die Gewährung von Sachmitteln. Unser Dank gilt ferner Fräulein *B. Jendry* und Fräulein *C. Jäschke* für ihre experimentelle Mitarbeit.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 (IR), Cary 14 (UV) und Bruker-Spektroskop HX 90 (NMR). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer

¹¹⁾ *M. Ohashi, M. Wilson, H. Budzikiewicz, M. Shamma, W. Slusarchyk und C. Djerassi, J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2807 (1963).

¹²⁾ *W. R. Gray und B. S. Hartley, Biochem. J.* **89**, 60 P (1963).

¹³⁾ *C. Djerassi, J. Beereboom, S. P. Marfey und S. K. Figdor, J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 484 (1955).

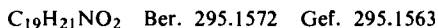
MS 9 (A.E.I.) durch Verdampfen der Substanzen in der Ionenquelle (bei ca. 200°C) bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen. Die Elementaranalysen führte das Mikrochemische Laboratorium Dr. F. Pascher, Bonn, aus.

Zur DC und PSC dienten Kieselgel PF₂₅₄ (Merck) sowie Aluminiumoxid neutral (Woelm), zur Säulenchromatographie (SC) Kieselgel Woelm 0.05–0.2 mm. Es kamen folgende Laufmittelsysteme zur Anwendung. System A: Chloroform/Methanol (50:1); System B: Methylchlorid/Methanol (10:1); System C: Cyclohexan/Aceton (1:1); System D: Benzol/Aceton/Methanol (50:30:1).

Isolierung und Auftrennung der Rohalkaloide: Der Extrakt (28 g) von 30 kg getrockneter Rinde von *Ziziphus amphibia* (vgl. dazu l. c.⁴⁾) wurde auf 2.5 kg Kieselgel im System A chromatographiert und wie folgt fraktioniert:

Fraktion-Nr.	Hauptsubstanz	Nebensubstanz	Menge
I	Vorlauf	—	3.8 g
II	Amphibin-A, -B	Amphibin-C, -D	5.7 g
III	Amphibin-B, -C	Amphibin-F	4.3 g
IV	Amphibin-C, -D, -F	Amphibin E	3.1 g
V	Amphibin-E, -G, Nuciferin	Amphibin-D	5.8 g
VI	Amphibin-H	Amphibin-E	1.0 g
VII	Amphibin-I	Amphibin-E, -H	0.6 g
VIII	Methanol-Eluat	—	1.8 g

(-)-Nuciferin (1): Auftrennung der Fraktion V durch mehrfache PSC an Kieselgel in den Systemen B und C ergab 200 mg reines **1**, das aus Aceton in farblosen Nadeln vom Schmp. 165°C (Lit.⁵⁾ 165.5°C) kristallisierte; $[\alpha]_D^{20} = -152^\circ$ ($c = 0.12$ in Äthanol) (Lit.⁵⁾ $[\alpha]_D^{20} = -157.5^\circ$ ($c = 1.0$ in Äthanol)).



Methojodid von **1**: Umsetzung von **1** mit Methyljodid lieferte ein kristallines Methojodid vom Schmp. 179°C (Lit.⁵⁾ 177–178°C).

Amphibin-I (2): Aus der Fraktion VII konnten durch PSC an Kieselgel in den Systemen B und D, sowie PSC an Aluminiumoxid im System C etwa 250 mg reines **2** in Form eines blaßgelben Schaumes abgetrennt werden. **2** ist leicht löslich in verd. Säuren, Alkoholen, Chloroform und Äther, jedoch nicht in Petroläther und wäßr. Laugen. $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ ($c = 0.6$ in Benzol).

IR (CHCl₃): 3340 (NH), 2820 (O–CH₃), 2780 (N–CH₃), 1655 (Amide) und 1240 cm⁻¹ (Phenoläther). — UV (Methanol): λ_{max} 282 nm ($\epsilon = 3100$) und starke „Endabsorption“. — ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.82 und 0.96 ppm (d, $J = 7$ Hz, 2 C–CH₃), 1.05 (d, $J = 6.5$ Hz, C–CH₃), 1.64 (s, NH₂), 2.54 (s, N–CH₃), 3.82 und 3.85 (s, 2 O–CH₃), 6.56 und 6.61 (s, je 1 Aromatenproton), 7.0 und 7.9 (2 NH).



Tetramethylamphibin-I-dijodid: 10 mg **2**, gelöst in 1 ml Methanol, wurden nach Zusatz von 1 ml Methyljodid 24 h unter Rückfluß erhitzt. Einengen i. Vak. und Kristallisation aus Chloroform/Methanol ergab Kristalle vom Schmp. 182–183°C; $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ ($c = 0.05$ in Methanol).



Amphibin-I-dihydrochlorid: Eine Lösung von 10 mg **2** in Methylenchlorid wurde mit 1 ml HCl-gesätt. Methylenchlorid versetzt und der ausfallende Niederschlag aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert. Farbloses Kristallpulver vom Zers.-P. 175°C; $[\alpha]_D^{20} = -3.4^\circ$ ($c = 0.24$ in Methanol).

$[C_{21}H_{36}N_4O_4]Cl_2$ (479.5) Ber. Cl 14.79 Gef. Cl 14.53

N-Acetylamphibin-I (**4**): 20 mg **2** in 0.5 ml Pyridin wurden mit 0.05 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 24 h Stehenlassen bei Raumtemp. wurde i. Vak. eingedampft und durch PSC an Kieselgel im System B gereinigt. Die Kristallisation aus Methylenchlorid ergab Nadeln vom Schmp. 188–190°C; $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ ($c = 0.1$ in Äthanol).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.9–1.0 ppm (d, $J = 7$ Hz, 3 C–CH₃), 2.05 (s, N–COCH₃), 2.45 (s, N–CH₃), 3.85 (s, 2 O–CH₃), 6.6 und 6.75 (s, je 1 Aromatenproton), 7.2 und 7.95 (2 NH).

$C_{23}H_{36}N_4O_5$ Ber. 448.2686 Gef. 448.2682

N,N-Dimethylamphibin-I (**3**): 20 mg **2** in 30 ml Methanol wurden nach Zusatz von 0.2 ml 35proz. Formalinlösung 5 h bei Raumtemp. über Pd/C unter Normaldruck hydriert. Nach Eindampfen i. Vak. wurde durch PSC an Kieselgel im System B gereinigt, wobei **3** als farblose, amorphe Substanz anfiel; $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ ($c = 0.15$ in Methanol).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.8 ppm (m, 3 C–CH₃), 2.24 (s, N(CH₃)₂), 2.4 (s, N–CH₃), 3.79 (s, 2 O–CH₃), 6.52 und 6.65 (s, je 1 Aromatenproton).

$C_{23}H_{38}N_4O_4$ Ber. 434.2896 Gef. 434.2871

Saure Hydrolyse von 2: Etwa 20 mg **2** in 2 ml 6 N HCl wurden im Bombenrohr 24 h auf 120°C erhitzt. Das Hydrolysat wurde im Exsikkator über KOH zur Trockene gebracht. Zum Nachweis der Aminosäuren wurden diese in die Dansylderivate übergeführt und zweidimensional chromatographiert (vgl. dazu l. c.⁴⁾). Zum Nachweis der terminalen Aminosäure wurde zunächst ins Dansylderivat übergeführt und dann hydrolysiert.

Saure Hydrolyse von 3: 5 mg **3** wurden wie für **2** beschrieben mit Salzsäure hydrolysiert. Der Nachweis der *N,N*-Dimethylaminosäure geschah unter Zuhilfenahme authent. Vergleichs-substanzen papierchromatographisch im System Butanon/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (40:2:1:6)¹⁴⁾.

Permanganatoxidation von 2: 80 mg **2** wurden in 1 ml 1 N H₂SO₄ gelöst und durch Zugabe von Natronlauge neutralisiert. Dann wurden 20 ml 1proz. Kaliumpermanganatlösung zugesetzt und 48 h gerührt. Zusatz von Methanol, erschöpfende Extraktion mit Äther und Einengen der organischen Phase i. Vak. ergab einen gelbbraunen Rückstand, der durch PSC an Kieselgel im System C aufgetrennt wurde. Dabei wurden etwa 4 mg 4,5-Dimethoxyphthal-säure und ungefähr die gleiche Menge 4,5-Dimethoxy-*N*-methylphthalimid (**5**) vom Schmp. 266°C erhalten. Der Misch-Schmp. mit synthetischem **5**¹³⁾ zeigte keine Depression.

Alkalische Hydrolyse von 2: 50 mg **2** in 10 ml Methanol wurden nach Zusatz von 1 ml 10proz. Natronlauge 18 h unter Schutzgas zum Sieden erhitzt. Nach Eindampfen i. Vak. wurde mit 1 ml Pyridin und 0.2 ml Acetanhydrid versetzt und 24 h bei 20°C gehalten. Einengen i. Vak. und Reinigung des erhaltenen braunen Öles an Kieselgel im System B erbrachte 15 mg **6** in feinen Nadeln vom Schmp. 162°C; $[\alpha]_D^{20} = -2.8^\circ$ ($c = 0.6$ in Methanol).

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.15 ppm (d, $J = 6$ Hz, CH₃), 1.96 (s, N–COCH₃), 2.53 (s, N–CH₃), 2.6 (m, –CH₂–CH₂–), 3.1 (m, CHCH₃), 3.82 (s, 2 O–CH₃), 4.05 (d, CHNCH₃), 6.15 (NH) und 6.54 (s, 2 Aromatenprotonen).

$C_{16}H_{24}N_2O_3$ Ber. 292.1787 Gef. 292.1776

¹⁴⁾ L. Reis, J. Chromatogr. **9**, 458 (1960).