

Alkaloide aus Rhamnaceen, XXV<sup>1)</sup>

## Nummularin-A, -B und -C, drei neue 13gliedrige Peptidalkaloide aus *Zizyphus nummularia*

Rudolf Tschesche\*, Ghulam A. Miana\*) und Gert Eckhardt

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,  
D-5300 Bonn, Max-Planck-S r.

Eingegangen am 10. Mai 1974

Aus dem Benzolextrakt der Wurzelrinde von *Zizyphus nummularia* wurden neben den bekannten Alkaloiden Mucronin-D (1) und Amphibin-H (2) drei weitere Peptidalkaloide Nummularin-A, -B und -C isoliert und ihre Strukturen geklärt (3–5). Alle genannten Alkaloide besitzen ein 13gliedriges Ringsystem, das aus 5-Hydroxy-2-methoxystyrylamin, *trans*-3-Hydroxyprolin und einer weiteren Aminosäure aufgebaut ist.

Alkaloids from Rhamnaceae, XXV<sup>1)</sup>

Nummularine-A, -B and -C, Three New 13-Membered Ring Containing Peptide Alkaloids from *Zizyphus Nummularia*

From the benzene extract of the root bark of *Zizyphus nummularia*, in addition to the known alkaloids Mucronin-D (1) and Amphibin-H (2), three further peptide alkaloids Nummularine-A, -B and -C have been isolated and their structures elucidated (3–5). All these alkaloids contain a thirteen-membered ring system formed by 5-hydroxy-2-methoxystyrylamine, *trans*-3-hydroxyproline and one other amine acid.

In den Pflanzen der Gattung *Zizyphus* kommen in reichem Maße Peptidalkaloide vor<sup>2)</sup>. Mit Ausnahme von Amphibin-I<sup>3)</sup> und Lasiodin-A<sup>4)</sup> sind alle bisher bekannten Verbindungen dieses Typs makrocyclisch und enthalten ein 13-, 14- oder 15gliedriges Ringsystem. In der Reihe der 13gliedrigen Peptidalkaloide wurden fünf Verbindungen isoliert und in ihrer Struktur geklärt: Mucronin-D (1) aus *Z. mucronata*<sup>5)</sup>, Amphibin-

\*) Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung. Heimatanschrift: Institute of Chemistry, University of Islamabad, Islamabad, Pakistan.

1) XXIV. Mitteil.: R. Tschesche, M. Elgamal, G. Eckhardt und M. v. Radloff, *Phytochemistry*, im Druck.

2) R. Tschesche und E. U. Klüßmann, *The Alkaloids* (Herausg. R. H. F. Manske), Academic Press, New York, im Druck; E. W. Warnhoff, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* (Wien), XXVIII, 162 (1971); M. Fais und F. X. Jarreau in B. Winstein (Herausg.), *Chemistry and Biochemistry of Aminoacids, Peptides and Proteins*, Bd. 1, S. 127, Marcel Dekker Inc., New York, 1971.

3) R. Tschesche, C. Spilles und G. Eckhardt, *Chem. Ber.* 107, 1329 (1974).

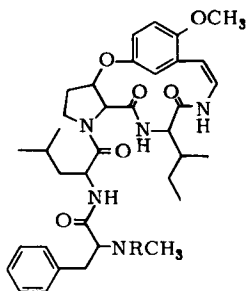
4) J. Marchand, M. Pais, X. Monseur und F. X. Jarreau, *Tetrahedron* 25, 937 (1967).

5) R. Tschesche, S. T. David, J. Uhlendorf und H. W. Fehlhaber, *Chem. Ber.* 105, 3106 (1972).

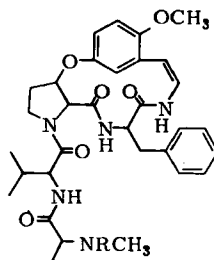
6) R. Tschesche, C. Spilles und G. Eckhardt, *Chem. Ber.* 107, 686 (1974).

H (2) aus *Z. amphibia*<sup>6)</sup> sowie Zizyphin-A (6)<sup>7)</sup>, -B (7) und -C (8) aus *Z. oenoplia*<sup>8)</sup>. Interessanterweise wurden in *Z. amphibia*<sup>6)</sup> nur 13- und 14gliedrige, in *Z. mucronata*<sup>5)</sup> und *Z. oenoplia*<sup>8)</sup> 13- und 15gliedrige, in *Z. mauritiana*<sup>9)</sup> 14gliedrige und in *Z. abyssinica*<sup>10)</sup> nur 15gliedrige Cyclopeptidalkaloide gefunden.

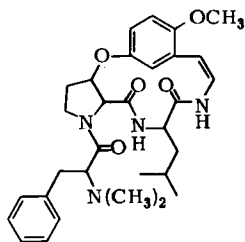
Im Rahmen unserer Arbeiten über Peptidalkaloide aus Rhamnaceen haben wir *Zizyphus nummularia*, gesammelt in Pakistan, auf seine basischen Inhaltsstoffe untersucht. Dabei wurden neben 1 und 2 eine Reihe weiterer Alkaloide isoliert, von denen drei, Nummularin-A (3), -B (4) und -C (5) hier beschrieben werden. Die Summenformeln wurden durch hochauflösende Massenspektrometrie zu  $C_{36}H_{49}N_5O_6$  (3),  $C_{32}H_{41}N_5O_6$  (4) und  $C_{31}H_{40}N_4O_5$  (5) ermittelt.



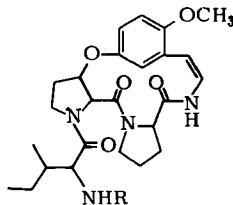
1, R = CH<sub>3</sub>, Mucronin-D  
3, R = H, Nummularin-A



2, R = CH<sub>3</sub>, Amphibin-H  
4, R = H, Nummularin-B



5, Nummularin-C



6, R = N, N-Dimethyl-Ile, Zizyphin-A  
7, R = N-Methyl-Ile, Zizyphin-B  
8, R = N, N-Dimethyl-Phe, Zizyphin-C

<sup>7)</sup> R. Tschesche, E. U. Kaufmann und G. Eckhardt, *Tetrahedron Letters* **1973**, 2577.

<sup>8)</sup> B. K. Cassels, G. Eckhardt, E. U. Kaufmann und R. Tschesche, *Tetrahedron*, im Druck.

<sup>9)</sup> R. Tschesche, H. Wilhelm, E. U. Kaufmann und G. Eckhardt, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.

<sup>10)</sup> R. Tschesche, S. T. David, R. Zerbes, M. v. Radloff, E. U. Kaufmann und G. Eckhardt, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.

## Absorptionsspektren

Die IR-Spektren von **3**, **4** und **5** sind mit denen der 13gliedrigen Cyclopeptidalkaloide **1** und **2** nahezu identisch und zeigen charakteristische Banden für sekundäre Amide (3270, 1690 und 1640  $\text{cm}^{-1}$ ), *O*-Methyl- (2820) und *N*-Methylgruppen (2770), C=C-Doppelbindungen (1610) und Phenoläther (1210 und 1025).

In den UV-Spektren von **3**, **4** und **5** treten bei 321 und 268 nm Absorptionsmaxima auf, die für den 2,5-Dialkoxystyryl-Chromophor typisch sind<sup>11)</sup> und somit auf ein 13gliedriges Ringsystem hinweisen<sup>5-8)</sup>.

Aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum folgt für **3**, **4** und **5** die Anwesenheit je einer Methoxy-, für **3** und **4** je einer Methylamino- und für **5** einer Dimethylaminogruppe. Im Bereich hohen Feldes wird bei **3** ein Signalkomplex entsprechend 4 *C*-Methylgruppen, bei **4** und **5** jeweils ein Dublett für die Methylgruppen der Valin- bzw. Leucineinheiten beobachtet. Im Spektrum von **4** tritt bei  $\delta = 1.34$  ppm ein Dublett auf, das von der Methylgruppe des Alanins herrührt. Das dem Aromaten benachbarte *cis*-Olefinproton liefert jeweils ein Dublett bei  $\delta = 5.9$  ppm ( $J = 9$  Hz).

## Massenspektren und Hydrolysen

Die Massenspektren von Nummularin-A (**3**) bzw. -B (**4**) weisen eine sehr große Ähnlichkeit mit denen von Mucronin-D (**1**) bzw. Amphibin-H (**2**) auf. Lediglich die Molekülonen sowie die Fragmente **a**, **b** und **m**<sup>\*)</sup> sind bei **3** und **4** um 14 Masseneinheiten nach tieferen Werten verschoben, woraus abgeleitet wurde, daß es sich bei **3** um *N*-Desmethyl-mucronin-D und bei **4** um *N*-Desmethyl-amphibin-H handeln könnte. Diese Vermutung wurde bestätigt durch reduzierende *N*-Methylierung<sup>11)</sup> von **3** und **4**, bei der aus **3** ein mit Dihydromucronin-D<sup>5)</sup> und aus **4** ein mit Dihydroamphibin-H<sup>6)</sup> identisches Produkt erhalten wurde.

Den Basispeak im Spektrum von **5** (Abb.) liefert das durch  $\alpha$ -Spaltung der terminalen *N,N*-Dimethylphenylalanin-Einheit gebildete Ion **a**. Das Aminfragment **9** weist auf Leucin bzw. Isoleucin, **10** auf Hydroxyprolin hin. Der Peak bei  $m/e$  165 (**11**) ist für die Methoxy-hydroxystyrylamin-Gruppe charakteristisch. Der schrittweise Abbau von **5** nach den für 13gliedrige Peptidalkaloide beschriebenen Regeln<sup>5-7)</sup> liefert die im Schema angegebenen Fragmente, mit deren Hilfe die Verknüpfung der Bausteine ermittelt werden kann. Wegen der verkürzten Seitenkette fehlen die Ionen **c**, **d**, **e** und **m** (vgl. l. c.<sup>6)</sup>).

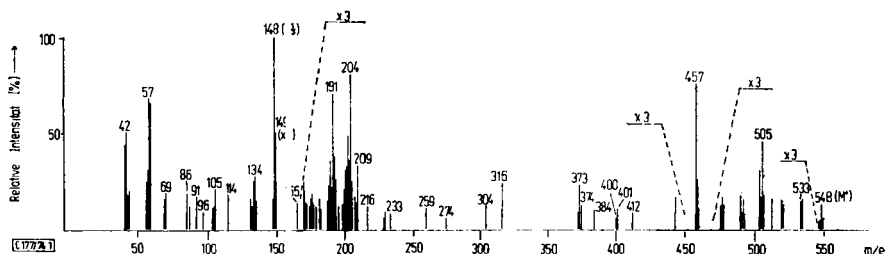
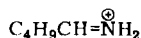


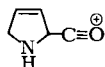
Abb. Massenspektrum von Nummularin-C (**5**)

<sup>\*)</sup> Für die Bezeichnung der Ionen vgl. l. c.<sup>6)</sup>

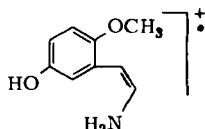
<sup>11)</sup> E. Zbiral, E. L. Menard und J. M. Müller, *Helv. Chim. Acta* **48**, 404 (1965).



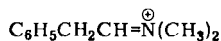
**9**, *m/e* 86



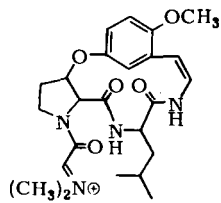
**10**, *m/e* 96



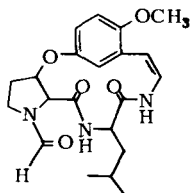
**11**, *m/e* 165



**a**, *m/e* 148



**b**, *m/e* 457



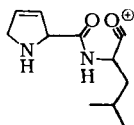
**f**, *m/e* 401



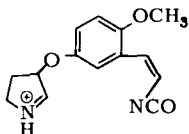
**g**, *m/e* 400



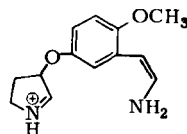
**h**, *m/e* 374



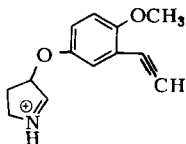
**p**, *m/e* 209



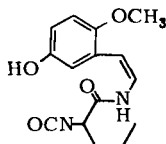
**r**, *m/e* 259



**s**, *m/e* 233



**t**, *m/e* 216



**u**, *m/e* 304

Im sauren Hydrolysat von Dihydrummmularin-C konnten papier- und dünnschichtchromatographisch die Aminosäuren Leucin sowie *N,N*-Dimethylphenylalanin nachgewiesen werden, somit besitzt Nummularin-C die angegebene Struktur **5**.

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.

G. A. Miana dankt der *Alexander-von-Humboldt-Stiftung* für die Gewährung eines Stipendiums und der Universität Islamabad für die Beurlaubung zu einem Forschungsaufenthalt in Bonn.

## 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), Varian A 60 sowie Bruker-Spektroskop HX 90 (NMR) und Cary 14 (UV). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer 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 Dünnschicht- und präparativen Schichtchromatographie (SchC) dienen Kieselgel PF<sub>254</sub> und G 60 (Merck), zur Säulenchromatographie (SC) Kieselgel Woelm 0.05–0.2 mm. Für die Papierchromatographie wurde die Sorte Whatman Nr. 1 benutzt. Das Pflanzenmaterial wurde im Mai und Juni 1973 auf dem Gelände der Universität Islamabad, Pakistan, gesammelt.

**Isolierung und Auftrennung der Rohalkaloide:** Aus 16 kg Rinde wurden durch ein modifiziertes Aufbereitungsverfahren (vgl. l. c.<sup>6)</sup> 30 g Rohalkaloid erhalten und dieses durch SC an Kieselgel in elf Fraktionen aufgetrennt. Laufmittel war Chloroform, dem in steigenden Mengen (2 bis 50%) Methanol zugesetzt wurde. Fraktion II (7.25 g) und Fraktion IX (3.1 g) wurden mittels SC, SchC und fraktionierter Kristallisation weiter aufgetrennt. SC von 5.71 g der Fraktion II mit Chloroform/Methanol-Gemischen lieferte die drei Unterfraktionen A (1.7 g), B (1.3 g) und C (1.8 g), von denen die polarste — A — mittels SchC im System Cyclohexan/Aceton (3:2) in vier Komponenten getrennt wurde. Nach steigender Polarität geordnet waren dies: A-8-A (0.8 g), A-8-B (0.3 g), A-8-C (0.3 g) und A-8-D (0.3 g).

**Mucronin-D (1)** wurde neben einem noch unbekanntem Peptidalkaloid aus der Fraktion A-8-C isoliert.

**Amphibin-H (2):** Ließ man die Lösung von Fraktion II in Methanol in der Kälte stehen, so kristallisierten farblose Nadeln aus. Wie die massenspektrometrische Untersuchung ergab, bestanden diese jedoch aus wenigstens vier Komponenten, die sich chromatographisch nicht vollständig trennen ließen. Deshalb wurden die Kristalle den Bedingungen einer Acetylierung unterworfen und das Reaktionsgemisch nach üblicher Aufarbeitung an Kieselgel chromatographiert. Die dabei erhaltene polarste Fraktion erwies sich in allen spektroskopischen Eigenschaften als identisch mit Amphibin-H.

**Nummularin-A (3)** wurde aus der Fraktion A-8-A (s. o.) durch mehrfache Kristallisation aus Methanol in farblosen Nadeln vom Schmp. 235–240°C (Zers.) isoliert;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-397^\circ$  ( $c = 0.2$ , CHCl<sub>3</sub>).

IR (KBr): 3270 (NH), 2820 (OCH<sub>3</sub>), 2770 (NCH<sub>3</sub>), 1680 und 1628 (Amide), 1610 (C=C), 1210 und 1025 cm<sup>-1</sup> (Phenoläther). — UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  268 (log  $\epsilon$  4.02) und 322 nm (3.73). — NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.6$ –1.0 ppm (m, 4 C-Methylgruppen), 2.31 (s, NCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, OCH<sub>3</sub>), 5.83 (d,  $J = 9$  Hz, 1 Olefinproton), 7.02–8.32 (m, Aromatenprotonen, NH und 1 Olefinproton).

C<sub>36</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Mol.-Masse Ber. 647.3683 Gef. 647.3669 (MS)

**Nummularin-B (4)** wurde durch mehrfache SchC der Fraktion IX im System Methylencchlorid/Aceton/Methanol (40:15:1) in einer Menge von 2 g erhalten. Aus Methanol farblose Nadeln vom Schmp. 230–231°C;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-390^\circ$  ( $c = 0.2$ , CHCl<sub>3</sub>).

IR (KBr): 3300 (NH), 2820 (OCH<sub>3</sub>), 2770 (NCH<sub>3</sub>), 1690 und 1640 (Amide), 1610 (C=C), 1220 und 1020 cm<sup>-1</sup> (Phenoläther). — UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  268 (log  $\epsilon$  4.05) und 321 nm (3.9). — NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.65$  ppm (dd,  $J = 5.5$  Hz, 2 C-Methylgruppen), 1.34 (d,

$J = 7$  Hz, 1 C-Methylgruppe), 2.47 (s, NCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, OCH<sub>3</sub>), 5.94 (d,  $J = 9$  Hz, 1 Olefinproton), 6.8–8.6 (m, Aromatenprotonen, NH und 1 Olefinproton).

C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (591.3) Ber. C 64.96 H 6.93 N 11.84  
 Gef. C 64.46 H 6.90 N 11.83  
 Mol.-Masse Ber. 591.3057 Gef. 591.3059 (MS)

*Nummularin-C* (5): Kristallisation der Fraktion A-8-B aus Methanol ergab 5 in farblosen Nadeln vom Schmp. 278–280°C;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-371^\circ$  ( $c = 0.2$ , CHCl<sub>3</sub>).

IR (KBr): 3300 (NH), 2850 (OCH<sub>3</sub>), 2775 (NCH<sub>3</sub>), 1670 und 1630 (Amide), 1610 (C=C), 1210 und 1025 cm<sup>-1</sup> (Phenoläther). — UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  270 (log  $\epsilon$  4.10) und 320 nm (3.65). — NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.0$  ppm (d, 2 C-Methylgruppen), 2.40 (s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.75 (s, OCH<sub>3</sub>), 4.38 (d,  $J = 5$  Hz, 2-H am Hypro), 5.84 (d,  $J = 9$  Hz, 1 Olefinproton), 6.66–8.32 (m, Aromatenprotonen, NH und 1 Olefinproton).

C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> Mol.-Masse Ber. 548.2999 Gef. 548.3002 (MS)

*N-Methyl-Derivate der Dihydroalkaloide*: Jeweils 100 mg der Alkaloide 3 und 4 wurden einer reduzierenden Methylierung mit Formaldehyd/Wasserstoff über Pd/C<sup>12)</sup> unterworfen. Anschließend Aufarbeitung und Kristallisation aus Methanol ergaben:

*N-Methyl-dihydrnummularin-A* in farblosen Nadeln vom Schmp. 250–252°C, welches sich als identisch mit Dihydromucronin-D<sup>5)</sup> erwies, sowie

*N-Methyl-dihydrnummularin-B* vom Schmp. 281°C;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-381^\circ$  ( $c = 0.2$ , Methanol), identisch mit Dihydroamphibin-H<sup>6)</sup>.

*Dihydrnummularin-C*: 30 mg 5 in 30 ml Methanol wurden über Palladium/Aktivkohle bei Normaldruck hydriert. Nach 5 h wurde die Lösung vom Katalysator abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Kristallisation aus Methanol lieferte ein farbloses Pulver vom Schmp. 291 bis 295°C.

C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> Mol.-Masse Ber. 550.3 Gef. 550 (MS)

*Hydrolyse von Dihydrnummularin-C*: 5 mg Dihydrnummularin-C wurden in 1 ml 6 N HCl im Bombenrohr 24 h auf 120–140°C erhitzt. Das Hydrolysat wurde im Exsikkator über KOH zur Trockne gebracht und in 1 ml Wasser aufgenommen. Der Nachweis von Leucin gelang durch papierchromatographischen Vergleich mit einer authentischen Probe in den Systemen n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5)<sup>13)</sup> sowie n-Butanol, gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4<sup>14)</sup> und Besprühen mit Ninhydrin, der von *N,N*-Dimethylphenylalanin durch Chromatographie auf Celluloseplatten im System Butanon/Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (40:2:1:6) und Anfärben mit Joddampf<sup>9)</sup>.

<sup>12)</sup> R. E. Bowman und H. H. Stroud, J. Chem. Soc. 1950, 1342.

<sup>13)</sup> S. M. Partridge, Biochem. J. 42, 238 (1948).

<sup>14)</sup> E. F. McFarren, Anal. Chem. 23, 168 (1951).