

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

## Nummularin-G, -H und -K, weitere Peptidalkaloide aus *Ziziphus nummularia*

Rudolf Tschesche\*, Mohamed Elgamal\*) und Gert Eckhardt

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn,  
Max-Planck-Str. 1, D-5300 Bonn

Eingegangen am 25. Oktober 1976

Aus *Ziziphus nummularia* wurden neben den bereits beschriebenen Nummularinen-A, -B, -C<sup>2)</sup>, -D, -E und -F<sup>3)</sup> drei weitere Peptidalkaloide, Nummularin-G, -H und -K isoliert und deren Konstitution geklärt (1, 3 und 5). Die Nummularine-G und -K besitzen 14gliedrige Cyclopeptidringe. Als Besonderheit weist 1 einen zusätzlichen Ring in der Seitenkette auf. Nummularin-H (3) gehört zu den 13gliedrigen Cyclopeptidalkaloiden und besitzt die Konstitution eines *N*-Desmethyljubanins-A<sup>1)</sup>.

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

Nummularin-G, -H and -K, New Alkaloids from *Ziziphus nummularia*

From *Ziziphus nummularia* in addition to the known alkaloids, nummularine-A, -B, -C<sup>2)</sup>, -D, -E, and -F<sup>3)</sup>, three further peptide alkaloids nummularine-G, -H, and -K have been isolated and their structures elucidated (1, 3, and 5). Nummularine-G and -K are fourteen-membered cyclopeptide ring systems. In 1 the nitrogen atom of the terminal amino acid is linked *via* a methylene group to the nitrogen atom of the hydroxyamino acid to form a five-membered ring. Nummularine-H (3) belongs to the thirteen-membered ring peptide alkaloids and has the structure of *N*-desmethyljubanine-A<sup>1)</sup>.

In zwei früheren Mitteilungen wurde die Isolierung und Konstitutionsaufklärung der Nummularine-A, -B und -C mit 13gliedrigem Ringsystem<sup>2)</sup> sowie -D, -E und -F mit 14gliedrigem Ringsystem<sup>3)</sup> aus *Ziziphus nummularia* beschrieben. Durch ein modifiziertes Aufarbeitungsverfahren, bei dem die getrocknete Rinde mit einem Gemisch aus wäßrigem Ammoniak und Methanol extrahiert und anschließend nach der üblichen Methode<sup>5)</sup> weiterverarbeitet wurde, konnte eine wesentlich höhere Ausbeute an Rohalkaloid gewonnen werden. Der Extrakt enthielt 14 Dragendorff-aktive Substanzen und wurde durch

\*) National Research Centre Kairo, Dokki.

<sup>1)</sup> XXVII. Mitteil.: R. Tschesche, I. Khokhar, H. Wilhelm und G. Eckhardt, *Phytochemistry* **15**, 541 (1976).

<sup>2)</sup> R. Tschesche, G. A. Miana und G. Eckhardt, *Chem. Ber.* **107**, 3180 (1974).

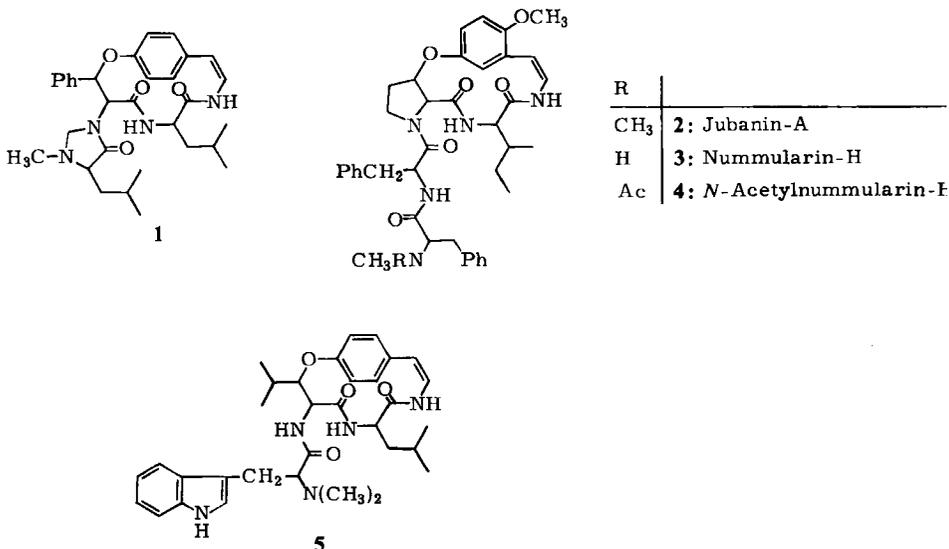
<sup>3)</sup> R. Tschesche, M. Elgamal, G. A. Miana und G. Eckhardt, *Tetrahedron* **31**, 2944 (1975).

<sup>4)</sup> R. Tschesche, E. U. Kaußmann und H.-W. Fehlhaber, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 865.

<sup>5)</sup> R. Tschesche, R. Welters und H.-W. Fehlhaber, *Chem. Ber.* **100**, 323 (1967).

mehrstufige Säulen- und Schichtchromatographie an Kieselgel in die Komponenten aufgetrennt.

Die Summenformeln der neu erhaltenen Alkaloide wurden durch hochauflösende Massenspektrometrie zu  $C_{31}H_{40}N_4O_4$  (**1**),  $C_{39}H_{47}N_5O_6$  (**3**) und  $C_{33}H_{43}N_5O_4$  (**5**) ermittelt.



### Absorptionsspektren

Die IR-Spektren von **1**, **3** und **5** sind weitgehend denen anderer 14- bzw. 13gliedriger Peptidalkaloide analog<sup>6)</sup>. Sie weisen die typischen Absorptionen für sekundäre Amide (3300, 1670 und 1630  $cm^{-1}$ ), N-Methylgruppen (2775), C=C-Doppelbindungen (1610) und Phenolether (1230 und 1030) auf. **3** zeigt bei 2815  $cm^{-1}$  die für O-Methylgruppen charakteristische Bande.

Im UV-Spektrum von **1** tritt nur eine starke Aromatenendabsorption mit schwachen Schultern bei 250 und 280 nm auf. **5** besitzt zusätzliche Absorptionsmaxima bei 273, 281 und 290 nm, die für Tryptophan als Baustein sprechen. **3** gibt Banden bei 320 und 268 nm, die für den 2,5-Dialkoxytyryl-Chromophor typisch sind<sup>7)</sup> und somit auf ein 13gliedriges Ringsystem hinweisen<sup>1-2, 6)</sup>.

Die C-Methylgruppen der Leucineinheiten von **1** erscheinen im PMR-Spektrum als Dubletts ( $J = 7$  Hz) bei  $\delta = 0.52, 0.73$  (je eine Methylgruppe) und 0.82 ppm (zwei Methylgruppen). Die N-Methylgruppe liefert ein Singulett bei  $\delta = 2.10$  ppm. Dem  $\alpha$ -H-Atom der endständigen Aminosäure wird der Signalkomplex bei  $\delta = 2.43$  ppm zugeordnet. Die beiden Methylenprotonen des zusätzlichen Fünfringes in **1** erscheinen als Doppeldubletts bei  $\delta = 3.18$  und 3.85 ppm mit einer geminalen Kopplungskonstanten von 5.4 Hz. Für das  $\alpha$ -H-Atom der an Styrylamin gebundenen Aminosäure beobachtet man einen Signalkomplex bei  $\delta = 4.14$  ppm, der sich nach Austausch

<sup>6)</sup> R. Tschesche und E. U. Kaufmann, The Alkaloids (Herausg. R. H. F. Manske), Bd. XV, S. 165, Academic Press, New York 1975.

<sup>7)</sup> E. Zbiral, E. L. Ménard und J. M. Müller, Helv. Chim. Acta **48**, 404 (1965).

der NH-Protonen gegen Deuterium zu dem X-Teil eines ABX-Spektrums vereinfacht. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methinprotonen der Phenylserineinheit liefern ein AB-Spektrum bei  $\delta = 5.12$  und  $6.01$  ppm. Aus der Kopplungskonstanten von  $8.5$  Hz kann auf eine *erythro*-Konfiguration der Hydroxyaminosäure geschlossen werden<sup>6)</sup>. Von den NH-Protonen erscheint eines als Dublett ( $J = 8.5$  Hz) bei  $\delta = 5.82$ , das andere zusammen mit den beiden Olefinprotonen in einem Signalkomplex bei  $\delta = 6.33$  bis  $6.84$  ppm. Nach Schütteln mit  $D_2O$  erhält man für die *cis*-Olefinprotonen ein AB-Spektrum ( $J = 7.8$  Hz), aus dem die chemische Verschiebung des zum Aromaten benachbarten Olefinprotons zu  $\delta = 6.47$ , die des anderen zu  $6.66$  ppm ermittelt werden kann. Bei  $\delta = 7.13$  absorbieren die zum Ethersauerstoffatom *ortho*-ständigen Aromatenprotonen, bei  $7.22$ – $7.62$  ppm die übrigen sieben Aromatenprotonen. In dem PMR-Spektrum von **3** erkennt man bei  $\delta = 0.88$ – $1.05$  ppm einen Signalkomplex für die beiden Methylgruppen der Isoleucineinheit, bei  $\delta = 2.31$  und  $3.81$  ppm je ein Singulett für die Methylamino- bzw. Methoxygruppe. Das dem Aromaten benachbarte *cis*-Olefinproton liefert ein Dublett bei  $\delta = 5.95$  ppm. Das PMR-Spektrum von **5** zeigt bei  $\delta = 0.41$  und  $0.68$  ppm Dubletts für die Methylgruppen der Leucin-, bei  $\delta = 0.97$  und  $1.25$  ppm Dubletts für die Methylgruppen der Hydroxyleucineinheit. Die Dimethylaminogruppe liefert ein scharfes Absorptionssignal bei  $\delta = 2.31$  ppm.

## Massenspektren

Nummularin-G (**1**) liefert wegen des zusätzlichen Ringes in der Seitenkette ein charakteristisch verändertes Massenspektrum (Abb.), verglichen mit dem üblicher Peptidalkaloide. Durch  $\alpha$ -Spaltung der terminalen Aminosäure entsteht als Primärfragment ledig-

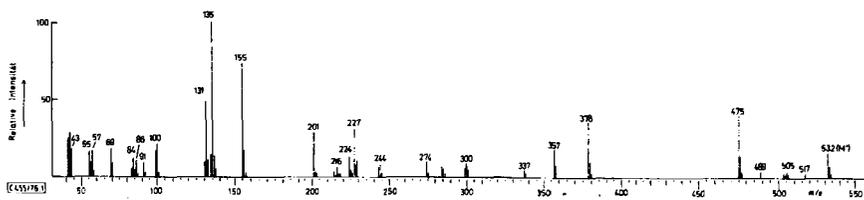


Abb. Massenspektrum von Nummularin-G (**1**)

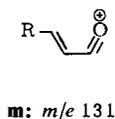
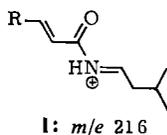
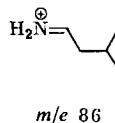
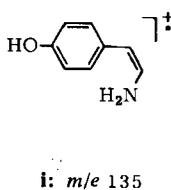
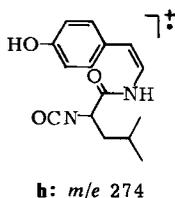
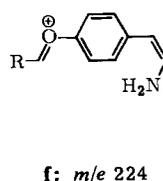
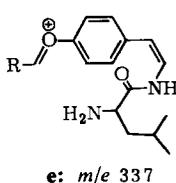
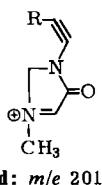
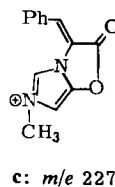
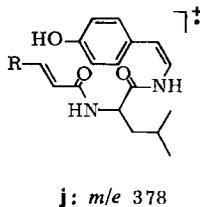
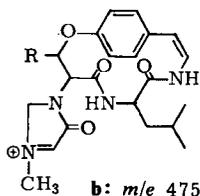
lich der Peak **b** ( $m/e$  475), das für alle bisher beschriebenen Verbindungen dieser Substanzklasse typische äußerst intensive ( $40$ – $60\%$  des Totalionenstroms) Aminfragment **a**<sup>6, 8)</sup> fehlt dagegen völlig. Die Abspaltung der cyclischen Seitenkette führt zu den Ionen  $C_8H_{15}N_2O^+$  ( $m/e$  155) und **j** ( $m/e$  378). Den Basispeak liefert das für die *p*-Hydroxystyrylaminogruppe charakteristische Ion **i** ( $m/e$  135). Weitere Fragmente können den Einzelbausteinen Phenylserin ( $m/e$  131) und einer  $C_6$ -Aminosäure ( $m/e$  86) zugeordnet werden. Die Ionen **f** ( $m/e$  224) und **h** ( $m/e$  274) zeigen, daß *p*-Hydroxystyrylamin einerseits mit Phenylserin verethert, andererseits mit Leucin amidartig verbunden ist. Die Fragmente **c** ( $m/e$  227) und **d** ( $m/e$  201) beweisen, daß die Seitenkette mit  $\beta$ -Phenylserin verknüpft ist. Die Ionen **k** ( $m/e$  244) und **l** ( $m/e$  216) bestätigen den Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Phenylserin und Leucin. Die Elementarzusammensetzungen aller aufgeführten Ionen wurden durch Hochauflösung gesichert.

Das Massenspektrum von Nummularin-H (**3**) weist eine sehr große Ähnlichkeit mit dem von Jubanin-A<sup>1)</sup> auf. Lediglich das Molekülion sowie alle Fragmente, welche die

<sup>8)</sup> H.-W. Fehlhaber, Z. Anal. Chem. 235, 91 (1968).

endständige Aminosäure enthalten, sind bei 3 um 14 Masseneinheiten nach tieferen Werten verschoben, woraus abgeleitet wurde, daß es sich bei 3 um *N*-Desmethyljubanin-A handeln könnte.

Das Massenspektrum von Nummularin-K (5) stimmt mit dem von Amphibin-A<sup>4)</sup> nahezu überein, somit dürften diese Verbindungen Isomere sein.



R = Ph

## Hydrolysen

Die Alkaloide 1 und 5 wurden katalytisch hydriert, Nummularin-H (3) wurde hydriert unter gleichzeitiger *N*-Methylierung<sup>9)</sup>. Nach einer Totalhydrolyse der so erhaltenen Dihydroalkaloide mit 6 N HCl im Bombenrohr bei 120°C ließen sich in den Hydrolysaten durch chromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen Leucin (bei 1 und 5), Isoleucin (bei 3), Phenylserin (bei 1), 3-Hydroxyleucin (bei 5) und Phenylalanin (bei 3) nachweisen. Neben den Aminosäuren befand sich in den Hydrolysaten von 1 und 5 *p*-Tyramin. Es wurde auf dem Papierchromatogramm mit Diazosulfanilsäure gekuppelt und damit von dem *ortho*- und *meta*-Isomeren durch unterschiedliche  $R_F$ -Werte<sup>10)</sup> und

<sup>9)</sup> R. E. Browman und H. H. Stroud, J. Chem. Soc. 1950, 1342.

<sup>10)</sup> R. Tschesche, E. Froberg und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. 103, 2501 (1970).

Farbreaktionen<sup>11)</sup> unterschieden. Im alkalischen Hydrolysat von **5** ließ sich papierchromatographisch *N,N*-Dimethyltryptophan nachweisen.

Umsetzung des Alkaloids **3** mit Ozon und anschließende Hydrolyse mit wäßrigem Bromwasserstoff<sup>7,12)</sup> erlaubte im Vergleich mit authentischem Material den papierchromatographischen Nachweis von *trans*-3-Hydroxyprolin.

Durch oxidative Spaltung der C=C-Doppelbindung von **4** mit OsO<sub>4</sub>/NaIO<sub>4</sub> in wäßrigem Aceton<sup>13)</sup> wurde ein Aminoaldehyd erhalten, dessen UV-Spektrum sowohl in neutraler als auch in saurer methanolischer Lösung dem von 2,5-Dimethoxybenzaldehyd<sup>14)</sup> gleich, wodurch die Substitution der Styrylamineinheit gesichert wurde.

Wir danken der *Stiftung Volkswagenwerk* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die zur Verfügung gestellten Spektrometer und letzterer auch für die Gewährung von Sachmitteln.

## Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroheiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter bestimmt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 (IR), Bruker-Spektrospin WH 90 (PMR), Cary 14 (UV). Die Massenspektren wurden mit den Massenspektrometern MS 9 und MS 50 (A. E. I.) durch Verdampfen der Substanzen in der Ionenquelle (Temp. ca. 200°C) bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen. Zur Dünnschicht- und präp. Schichtchromatographie (SchC) dienten Kieselgel F<sub>254</sub> + 366 (Merck) oder Cellulose (Excorna, Mainz), zur Säulenchromatographie (SC) Kieselgel 0.05–0.2 mm. Für die Papierchromatographie wurde die Sorte Whatman Nr. 1 benutzt.

### Isolierung und Auftrennung der Rohalkaloide

4.3 kg getrocknete Rinde wurden fein gemahlen und in Portionen von 1 kg viermal mit je 3 Liter Methanol, das zuvor mit konz. Ammoniak auf pH 9 gebracht wurde, extrahiert. Die Extrakte wurden i. Vak. bis zur sirupösen Konsistenz eingeeengt. Dann wurde mit dem doppelten Vol. Wasser verdünnt und fünfmal mit je 500 ml Benzol ausgeschüttelt. Nach Extraktion der organischen Phase fünfmal mit 200 ml 5proz. wäßr. Citronensäure machte man erneut ammoniakalisch und schüttelte viermal mit je 300 ml Chloroform aus. Nach Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man 9.03 g Rohalkaloid (0.21%, bezogen auf trockene Rinde), das durch Säulenchromatographie an Kieselgel in 11 Fraktionen aufgetrennt wurde. Als Elutionsmittel diente Chloroform, dem in steigender Menge (1–30%) Methanol zugesetzt wurde.

Fraktion II (0.300 g), Fraktion III (2.401 g) und Fraktion V (0.150 g) wurden mittels SC und SchC weiter aufgetrennt. Fraktion II wurde durch SchC nach dreimaliger Entwicklung mit dem System Benzol/Aceton/Methanol (35:15:1) in die Fraktionen IIa und IIb zerlegt. Fraktion III wurde mittels SC in Chloroform/Methanol-Gemischen in vier Fraktionen aufgetrennt, die nach steigender Polarität IIIa (0.15 g), IIIb (0.125 g), IIIc (0.200 g) und IIId (0.300 g) benannt wurden. Fraktion V wurde durch SchC im System Benzol/Aceton/Methanol (35:15:2.5) weiter aufgetrennt.

*Nummularin-G* (1): Aus der Fraktion IIb wurden nach mehrfacher SchC mit Cyclohexan/Aceton/Methanol (37.5:12.5:1) 0.015 g *Nummularin-G* gewonnen. Es kristallisiert aus Chloroform/Petrolether in hellgelben Nadeln vom Schmp. 174–175°C;  $[\alpha]_D^{20} = -133^\circ$  ( $c = 0.085$ , Methanol).

<sup>11)</sup> R. Tschesche, L. Behrendt und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **102**, 50 (1969).

<sup>12)</sup> R. Tschesche, E. U. Kaufmann und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **105**, 3094 (1972).

<sup>13)</sup> R. Pappo, D. S. Allen jr., I. U. Lemieux und W. S. Johnson, J. Org. Chem. **21**, 478 (1956).

<sup>14)</sup> E. P. Crowell, W. A. Powell und C. J. Vassel, Anal. Chem. **35**, 184 (1963).

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3330 (NH), 2950–2880 (CH), 2800 (NCH<sub>3</sub>), 1675 (Amid-CO), 1610 (C=C), 1585 bis 1485 (Aromaten), 1220, 1025 cm<sup>-1</sup> (Phenoether). – UV (Methanol): starke Endabsorption mit Schultern bei 250 und 280 nm. – PMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.52$  ( $J = 7$  Hz, CH–CH<sub>3</sub>), 0.73 (d,  $J = 7$  Hz, CH–CH<sub>3</sub>), 0.82 (d,  $J = 7$  Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.10 (s, NCH<sub>3</sub>), 2.43 (m, H<sub>3</sub>C–N–CH–CO), 3.18 (dd,  $J_1 = 5.4$  Hz und  $J_2 = 1.8$  Hz, 1H der N–CH<sub>2</sub>–N(CH<sub>3</sub>)-Methylengruppe), 3.85 (dd,  $J_1 = 5.4$  Hz und  $J_2 = 0.9$  Hz, 1H der N–CH<sub>2</sub>–N(CH<sub>3</sub>)-Methylengruppe), 4.14 (m; nach Austausch mit D<sub>2</sub>O X-Teil eines ABX-Spektrums, CO–NH–CH–CO), 5.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, O–CH(Ph)–CH), 5.82 (d,  $J = 8$  Hz, NH), 6.01 (d,  $J = 8.5$  Hz, O–CH(Ph)–CH), 6.33–6.84 (m, 2 Olefinprotonen und NH; nach Austausch mit D<sub>2</sub>O: 6.47 (d,  $J = 7.8$  Hz, HN–CH=CH), 6.66 (d,  $J = 7.8$  Hz, HN–CH=CH), 7.13 (AA'-Teil eines AA''BB''-Spektrums,  $J_{AB} = 7.5$  Hz, zum Ethersauerstoff ortho-ständige Aromatenprotonen), 7.22–7.62 ppm (7H, Aromatenprotonen).

C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> Mol.-Masse Ber. 532.3050 Gef. 532.3042 (MS)

*Dihydronummularin-G*: 10 mg des Alkaloids in 20 ml Methanol wurden über Palladium/Aktivkohle bei Normaldruck hydriert. Nach etwa 8 h wurde die Lösung durch eine Glassinterfritte abfiltriert und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde mittels SchC gereinigt. Farbloses Pulver vom Schmp. 206–209°C;  $[\alpha]_D^{20} = -98^\circ$  ( $c = 0.2$ , Methanol).

C<sub>31</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> Mol.-Masse Ber. 534.3 Gef. 534 (MS)

*Nummularin-H* (3) wurde durch mehrfache SchC der Fraktion IIIb im System Benzol/Essigester/Methanol (25:15:3.5) in einer Menge von 110 mg erhalten. Aus Methanol kristallisierte es in farblosen Nadeln vom Schmp. 194–196°C;  $[\alpha]_D^{20} = -343^\circ$  ( $c = 0.27$ , Methanol).

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3345 (NH), 2835 (OCH<sub>3</sub>), 2795 (NCH<sub>3</sub>), 1670 und 1630 (Amide), 1610 (C=C), 1230 und 1020 cm<sup>-1</sup> (Phenoether). – UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  268 (lg  $\epsilon$  4.05) und 320 nm (3.65). – PMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.88$ –1.05 (m, 2C–CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, NCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, OCH<sub>3</sub>), 4.31 (d,  $J = 4$  Hz, 2-H am Hypro), 5.95 (d,  $J = 9$  Hz, 1 Olefinproton), 6.87–7.87 ppm (m, Aromatenprotonen, NH und 1 Olefinproton).

C<sub>39</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Mol.-Masse Ber. 681.3526 Gef. 681.3539 (MS)

*N-Acetylnummularin-H* (4): 30 mg 3 wurden in 1.5 ml wasserfr. Pyridin und 1.5 ml Acetanhydrid gelöst und 24 h bei Raumtemp. stehengelassen. Dann wurde Ethanol zugegeben und der Überschuss an Acetanhydrid und Pyridin abdestilliert. Der Rückstand wurde durch SchC gereinigt. Schmp. 135°C (Chloroform/Petrolether);  $[\alpha]_D^{20} = -205^\circ$  ( $c = 0.1$ , Methanol).

PMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.87$ –1.07 (2C–CH<sub>3</sub>), 1.86 (s, NCOCH<sub>3</sub>), 2.76 (s, NCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, OCH<sub>3</sub>), 5.95 (d,  $J = 9$  Hz, 1 Olefinproton), 7.11–7.31 ppm (m, Aromatenprotonen, NH und 1 Olefinproton).

C<sub>41</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> Mol.-Masse Ber. 723.3 Gef. 723 (MS)

*N-Methyl-dihydronummularin-H*: Eine Lösung von 20 mg 3 in 50 ml Methanol wurde mit 1 ml 35proz. Formalinlösung und 0.01 g 10proz. Pd/C versetzt und das Gemisch unter Durchleiten von Wasserstoff 6 h gerührt<sup>9)</sup>. Nach Filtrieren und Eindampfen der Lösung i. Vak. chromatographierte man im System Benzol/Essigester/Methanol (25:15:3.5) auf Kieselgel. Schmp. 247 bis 249°C;  $[\alpha]_D^{20} = -148^\circ$  ( $c = 0.06$ , Methanol).

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3350 (NH), 2860 (OCH<sub>3</sub>), 2795 (NCH<sub>3</sub>), 1665 und 1635 (Amide), 1615 (C=C), 1225 und 1030 cm<sup>-1</sup> (Phenoether). – PMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.86$ –0.97 (m, 2C–CH<sub>3</sub>), 2.24 (s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.8 (s, OCH<sub>3</sub>), 4.1 (d,  $J = 4$  Hz, 2-H am Hypro), 6.63–7.27 ppm (m, Aromatenprotonen, NH).

C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> Mol.-Masse Ber. 697.34 Gef. 697 (MS)

*Nummularin-K* (5): Kristallisation der Fraktion V aus Methanol ergab ein farbloses Pulver vom Schmp. 237–239°C;  $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$  ( $c = 0.04$ , Methanol).

IR (KBr): 3235 (NH), 2790 (NCH<sub>3</sub>), 1675 und 1625 (Amide), 1610 (C=C), 1235 und 1045 cm<sup>-1</sup> (Phenoether). — UV (Methanol): 290 (lg ε 3.71), 281 (3.79) und 273 nm (3.81). — PMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.41 und 0.86 (je ein d, J = 7 Hz, —CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> des Leucin), 0.97 und 1.25 (je ein d, J = 7 Hz, —CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> des Hydroxyleucin), 2.31 (s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 6.33–7.26 ppm (m, Aromatenprotonen, NH, 1 Olefinproton).

C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> Mol.-Masse Ber. 573.3315 Gef. 573.3320 (MS)

*Dihydronummularin-K*: 8 mg **5** wurden wie oben beschrieben hydriert. Farbloses Pulver vom Schmp. 283–285 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +12° (c = 0.08, Methanol).

C<sub>33</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> Mol.-Masse Ber. 575.34 Gef. 575 (MS)

*Totalhydrolysen*: Die Lösung von jeweils 5–10 mg des Dihydro- oder *N*-Methyldihydroderivates in 1 ml 6 N HCl wurde in ein dickwandiges Glasrohr eingeschmolzen und 18 h auf 120 °C erhitzt. Das Hydrolysat wurde i. Vak. über KOH getrocknet und anschließend mit 1 ml Wasser aufgenommen. Man verglich chromatographisch mit authentischen Verbindungen auf Papier und Celluloseplatten, wobei folgende Fließmittelsysteme angewandt wurden:

a) Für die Dünnschichtchromatographie auf Cellulose:

1. Butanon/Pyridin/Wasser/Eisessig (70:15:15:2)<sup>15)</sup>
2. Butanon/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (40:2:1:6)<sup>16)</sup>

b) Zur Papierchromatographie:

1. *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5)<sup>17)</sup>
2. *tert*-Butylalkohol/Boratpuffer vom pH 8.4 (85:15)<sup>18)</sup>

*Alkalische Totalhydrolyse*: 10 mg Nummularin-K wurden mit 60 mg Ba(OH)<sub>2</sub> in 1 ml Wasser 24 h im geschlossenen Glasrohr auf 120 °C erhitzt. Das Hydrolysat wurde mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert, zentrifugiert, getrocknet und anschließend papierchromatographisch im System Pentanol/Pyridin/Wasser untersucht. Die Aminosäure (Tryptophan) ließ sich mittels Ehrlichs Reagenz sichtbar machen.

*Nachweis des trans-3-Hydroxyprolins*: 40 mg Nummularin-H wurden nach dem Verfahren von Zbiral und Mitarbb.<sup>7)</sup> einer Ozonolyse und anschließender Hydrolyse unterworfen. Es wurde im Vergleich mit 4-Hydroxyprolin (R<sub>F</sub> in A 0.0858, in B 0.0944), *cis*-3-Hydroxyprolin (R<sub>F</sub> in A 0.0686, in B 0.1041) und *trans*-3-Hydroxyprolin (R<sub>F</sub> in A 0.1005, in B 0.118) in den Systemen A: *tert*-Amylalkohol/2,4-Lutidin/Wasser (178:178:110)<sup>19)</sup> und B: *n*-Butanol, gesättigt mit 10proz. Diethylamin<sup>20)</sup>, auf Papier chromatographiert. Aufgrund der R<sub>F</sub>-Werte und der Farbreaktion mit Isatin-Reagenz wurde *trans*-3-Hydroxyprolin identifiziert.

*Oxidative Spaltung der Doppelbindung*: Zu einer Lösung von 50 mg **4** in 10 ml Aceton und 7.5 ml Wasser wurden ca. 3 mg OsO<sub>4</sub> gegeben und dann innerhalb von 30 min 44 mg NaIO<sub>4</sub> unter ständigem Rühren bei Raumtemp. eingetragen. Man rührte noch weitere 90 min, engte die Mischung i. Vak. ein und extrahierte sie fünfmal mit je 20 ml Chloroform. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen, Eindampfen und Chromatographieren im System Benzol/Essigester/Methanol (25:15:3.5) auf Kieselgel erhielt man 30 mg des Aminoaldehyds als amorphes farbloses Pulver. — UV (Methanol): λ<sub>max</sub> 345, 255, 224; (Methanol + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 292, 225 nm.

<sup>15)</sup> P. Wollenweber, J. Chromatogr. **9**, 369 (1962).

<sup>16)</sup> L. Reis, J. Chromatogr. **4**, 458 (1960).

<sup>17)</sup> S. M. Partridge, Biochem. J. **42**, 238 (1948).

<sup>18)</sup> E. F. McFarren, Anal. Chem. **23**, 168 (1951).

<sup>19)</sup> F. Irreverre, K. Monita, A. V. Robertson und B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc. **85**, 2824 (1963).

<sup>20)</sup> J. C. Sheehan und J. G. Whitney, J. Am. Chem. Soc. **85**, 3863 (1963).