

## Die Konstitution des Peptidalkaloides Zizyphinin

(aus *Zizyphus oenoplia Mill.*)

Von

M. Pailer, E. Haslinger und E. Zbiral

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 22. Mai 1969)

Es wird für das Zizyphinin die Konstitutionsformel II angegeben, die auf Grund von vergleichenden spektroskopischen Untersuchungen am Zizyphin und Zizyphinin bzw. der bei der sauren Hydrolyse erhaltenen Dipeptidester sehr wahrscheinlich war. Durch N-Methylierung des Peptidesters IV zum Peptidester III und Methylierung von Zizyphinin zu Zizyphin konnte die Formel II bewiesen werden.

### *The Constitution of the Peptide Alkaloid Zizyphinine*

The formula II for zizyphinine is discussed, which was concluded from comparing spectroscopic investigations of zizyphine and zizyphinine and their dipeptide esters. The latter were obtained by acid hydrolysis of zizyphine and zizyphinine.

Formula II was proved by N-methylation of peptide ester IV to peptide ester III and methylizing zizyphinine to zizyphine.

Vor einiger Zeit wurde über die Isolierung<sup>1</sup> zweier peptidischer Alkaloide aus *Zizyphus oenoplia Mill.*, einem im südöstlichen tropischen Asien sowie in Australien beheimateten Strauch, berichtet. Für das Hauptalkaloid Zizyphin ( $C_{33}H_{49}O_6N_5$ ) konnte eine eindeutige Konstitutions- und Konfigurationsformel I von Zbiral ermittelt werden<sup>2, 3</sup>. Als Nebenkomponente wurde das Zizyphinin ( $C_{32}H_{47}O_6N_5$ ), II, isoliert. Die

<sup>1</sup> E. L. Ménard, J. M. Müller, A. F. Thomas, S. S. Bhatnagar und N. J. Dastoor, *Helv. Chim. Acta* **46**, 1801 (1963).

<sup>2</sup> E. Zbiral, E. Ménard und J. Müller, *Österr. Chemiker-Ztg.* **64**, 300 (1963).

<sup>3</sup> E. Zbiral, E. L. Ménard und J. M. Müller, *Helv. Chim. Acta* **48**, 404 (1965).

seither berichteten Ergebnisse auf dem Gebiet dieser interessanten Naturstoffe<sup>4-18</sup>, die in allen Fällen zu I verwandte Strukturelemente beinhalten, veranlaßten uns, die Konstitutionsermittlung für II durchzuführen.

Vom Zizyphinin fanden sich in den zitierten Arbeiten eine Reihe von spektroskopischen und analytischen Daten, die die Vermutung nahelegten, daß es sich um eine sehr ähnliche Substanz handeln müsse. Die massenspektroskopische Untersuchung<sup>1</sup> ergab beim Zizyphinin einen Mindergehalt von einer CH<sub>2</sub>-Gruppe gegenüber dem Zizyphin. Dieses Ergebnis konnten wir bestätigen; weiters waren die von uns aufgenommenen Infrarotspektren des Zizyphins und des Zizyphinins im wesentlichen deckungsgleich und zeigten nur in dem für die N-Methylschwingungen charakteristischen Bereich Abweichungen. So hatte das Spektrum des Zizyphins eine intensivere Bande bei 1825 cm<sup>-1</sup> als das des Zizyphinins. Außerdem trat beim Zizyphinin bei 3340 cm<sup>-1</sup> eine Bande auf, die der NH-Schwingung einer sekundären Aminogruppe zugeordnet werden kann. Das Kernresonanzspektrum von Zizyphinin zeigte ein gegenüber dem Spektrum von Zizyphin zu höheren  $\delta$ -Werten verschobenes N—CH<sub>3</sub>-Signal. Die Auswertung der Integrationskurve ergab, daß es sich wahrscheinlich um eine Methylgruppe handelt.

Bei der Hydrolyse des Zizyphins durch 14stdg. Kochen mit 6*n*-HCl und anschließende Veresterung, konnte man einen Dipeptidester isolieren, der sich auf Grund von spektroskopischen Daten, der Spaltung in Amino-

<sup>4</sup> M. Pais, J. Mainil und R. Goutarel, Ann. Pharm. Franc. **21**, 139 (1963).

<sup>5</sup> O. Blanpin, M. Pais und M. A. Quevauviller, Ann. Pharm. Franc. **21**, 147 (1963).

<sup>6</sup> M. Pais, X. Monseur, X. Lusinchi und R. Goutarel, Bull. Soc. Chim. France **1964**, 817.

<sup>7</sup> E. W. Warnhoff, S. K. Pradhan und J. C. N. Ma, Canad. J. Chem. **43**, 2594 (1965).

<sup>8</sup> E. W. Warnhoff, J. C. N. Ma und P. Reynolds-Warnhoff, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 4198 (1965).

<sup>9</sup> M. Pais, F.-X. Jarreau, X. Lusinchi und R. Goutarel, Ann. Chim. [13] **11**, 83 (1966).

<sup>10</sup> R. Tschesche, R. Welters und H.-W. Fehlhäber, Chem. Ber. **100**, 323 (1967).

<sup>11</sup> M. Pais, J. Marchand, X. Monseur, F.-X. Jarreau und R. Goutarel, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. **264**, 1409 (1967).

<sup>12</sup> R. Tschesche, J. Rheingans, H.-W. Fehlhäber und G. Legler, Chem. Ber. **100**, 3924 (1967).

<sup>13</sup> R. Tschesche, H. Last und H.-W. Fehlhäber, Chem. Ber. **100**, 3937 (1967).

<sup>14</sup> F. K. Klein und H. Rapoport, J. Amer. Chem. Soc. **90**, 2398 (1968).

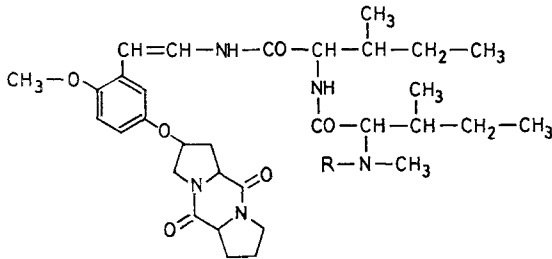
<sup>15</sup> R. Tschesche, E. Froberg und H.-W. Fehlhäber, Tetrahedron Letters **1968**, 1311.

<sup>16</sup> R. Tschesche und H. Last, Tetrahedron Letters **1968**, 2993.

<sup>17</sup> R. Tschesche und I. Reutel, Tetrahedron Letters **1968**, 3817.

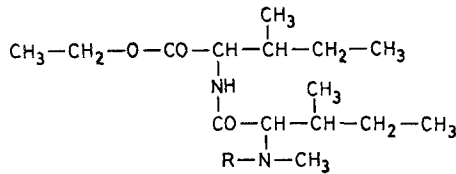
<sup>18</sup> R. Tschesche, L. Behrendt und H.-W. Fehlhäber, Chem. Ber. **102**, 50 (1969).

säuren und endlich durch Synthese als L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylester (III) charakterisieren ließ<sup>2, 3</sup>. Wir haben das Zizyphinin in ähnlicher Weise gespalten wie das Zizyphin und schließlich einen Dipeptidester vom Schmelzpunkt 63—66° C isoliert, der sich auf Grund der massenspektrometrischen Daten von dem entsprechenden Abbau-Produkt des Zizyphins durch den Mindergehalt einer CH<sub>2</sub>-Gruppe unter-



I R = CH<sub>3</sub>

II R = H



III R = CH<sub>3</sub>

IV R = H

schied. Das Infrarotspektrum dieses Dipeptidesters IV zeigte weitgehende Analogie zum Spektrum von III; es unterschied sich, wie zu erwarten war, im Bereich der NH-Schwingungen und im Bereich der N-Methylschwingungen. Bei IV trat neben der NH-Schwingung der Peptidbindung eine weitere Bande auf, die der NH-Streckschwingung einer sekundären Aminogruppe zuzuordnen ist. Auch die bei III vorhandene, für die N-Dimethylgruppe charakteristische Bande im Bereich von 2825 cm<sup>-1</sup>, war beim Peptid aus Zizyphinin nicht feststellbar. Die Ergebnisse der Infrarotspektroskopie wurden durch Vergleich der Kernresonanzspektren der beiden Substanzen III und IV bestätigt. Beim Dipeptidester aus Zizyphin war ein bei  $\delta = 2,28$  ppm auftretendes Signal eindeutig einer Dimethylaminogruppe zuzuordnen, im Spektrum des aus Zizyphinin dargestellten Dipeptidesters lag eine entsprechende Bande, die allerdings nur drei Wasserstoffatome entsprach, bei  $\delta = 2,47$  ppm. Eine Verschiebung nach höheren  $\delta$ -Werten ist beim Übergang von einer Dimethyl- zu einer Monomethylaminogruppe zu erwarten. Außerdem trat bei  $\delta = 2,29$  ppm

ein Signal für ein Wasserstoffatom auf, das der NH-Gruppierung zugeordnet werden kann.

Der Dipeptidester aus Zizyphinin IV wurde mit Formaldehyd hydrierend methyliert und das so gewonnene N-Dimethylderivat mit dem L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucinäthylester (III) aus Zizyphin verglichen. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression, die gaschromatographisch gemessenen  $R_f$ -Werte waren identisch, die Infrarotspektren waren deckungsgleich.

Der Vollständigkeit halber wurde auch das Zizyphinin in ähnlicher Weise methyliert, wobei ein Produkt erhalten wurde, das bei der Dünnschichtchromatographie denselben  $R_f$ -Wert wie Zizyphin hatte.

Danach entspricht Formel II dem Zizyphinin.

Der eine von uns (E. Z.) dankt dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Liebiggasse 5, 1010 Wien.

### Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden am Heizmikroskop nach *Kofler* bestimmt. Destillationen und Sublimationen wurden im Kugelrohr ausgeführt, die Temperaturangaben beziehen sich auf das umgebende Luftbad. Die Infrarotspektren wurden auf einem Perkin-Elmer-Spektrographen, Modell 237, die Kernresonanzspektren auf einem Varian A 60 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Bei kleinen Substanzmengen wurde ein Time Averaging Computer verwendet.

Wir danken Herrn Doz. Dr. J. *Seibl*, ETH Zürich, für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn Dr. H. *Egger* für wertvolle Ratschläge bei der Interpretation von Spektren und Herrn Dr. W. *Silhan* für die Aufnahme der Kernresonanzspektren.

#### *Isolierung und Trennung der Alkaloide*

Die bei der Aufarbeitung der Wurzelrinde<sup>1</sup> erhaltene Oxalatfällung wurde wie folgt weiterverarbeitet:

15 g Oxalat wurden in 750 ml Äther und 50 ml Wasser gelöst und durch Ausschütteln mit 100 ml *n*-NaOH in die Basen übergeführt. Nach Trennung der Schichten wurde die wäßr. Phase noch 2mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Alle Ätherphasen wurden 2mal mit je 100 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit  $K_2CO_3$  und Eindampfen im Vak. erhielt man 11,0 g gelblichen Schaum. Das Basengemisch wurde in 50 ml Aceton—Benzol (1 : 1) gelöst, auf eine mit Kieselgel H gefüllte Säule (Durchmesser: 4 cm, Höhe: 60 cm) aufgebracht und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch nach folgendem Schema eluiert:

ml	
0—160	leer
160—390	nur Zizyphin enthaltend
390—450	Basengemisch
450—800	nur Zizyphinin enthaltend.

Insgesamt erhielt man 9,0 g Zizyphin und 0,2 g Zizyphinin.

*Isolierung des L-(N-Methyl-isooleucyl)-L-isooleucinäthylesters*

45 mg Zizyphinin wurden 14 Stdn. in 2 ml 6*n*-HCl unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung färbte sich nach einiger Zeit dunkelviolett. Nach Abdampfen der Salzsäure im Vak. entfernte man das restliche Wasser durch mehrmaliges Aufnehmen in absol. Alkohol und anschließendes Eindampfen zur Trockene. Nach nochmaligem Lösen in absol. Äthanol wurde trock. HCl-Gas bis zur Sättigung eingeleitet und anschließend im Vak. abgedampft. Die durch Aufnehmen des Rückstandes in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> entstandene Suspension versetzte man mit 10 ml einer mit NH<sub>3</sub> gesätt. Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde aus dem Rückstand mit Äther der Dipeptidester herausgelöst. Den nach Verdunsten des Äthers verbleibenden Rückstand destillierte man 2mal im Kugelrohr (100° bis 120° C, 0,001 Torr). Die übergegangene zähe Flüssigkeit kristallisierte nach einiger Zeit völlig; Schmp. 63—66° C.

*N-Methylierung des L-(N-Methyl-isooleucyl)-L-isooleucinäthylesters*

Es wurde dabei analog zur Darstellung des L-N,N-Dimethylisooleucins verfahren<sup>19</sup>. 4 mg Dipeptidester, gelöst in 0,5 ml wäbr. Methanol (10% Wasser) versetzte man mit 12 µl wäbr. 37proz. Formaldehydlösung sowie 2 mg Pd-C (10% Pd) und rührte heftig in Wasserstoffatmosphäre. Die Reaktion war nach etwa 12 Stdn. beendet; dann dampfte man das Lösungsmittel im Vak. ab und entfernte den restlichen Formaldehyd durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser. Der Rückstand wurde im Kugelrohr im Hochvak. destilliert. Das bei 100—120° C übergegangene Öl kristallisierte sofort beim Animpfen mit einem Kriställchen des aus Zizyphin dargestellten L-(N,N-Dimethyl-isooleucyl)-L-isooleucinäthylesters. Schmp. 53—57° C. Mischschmelzpunkt mit III gab keine Depression.

*Methylierung des Zizyphinins zu Zizyphin*

Es wurde nach der gleichen Vorschrift wie oben beschrieben verfahren. 5 mg Zizyphinin, gelöst in 0,5 ml wäbr. Methanol (10% Wasser) wurden mit 10 µl 37proz. wäbr. CH<sub>2</sub>O-Lösung und 2 mg Pd-C (10% Pd) versetzt und das Gemisch in einer Wasserstoffatmosphäre heftig gerührt. Nach 8 Stdn. wurde die Reaktion unterbrochen, überschüss. Formaldehyd durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser entfernt. Dann nahm man den Rückstand mit Äther auf, trocknete die Lösung mit NaCl, filtrierte und dampfte im Vak. das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wurde dünnschichtchromatographisch mit Zizyphin und Zizyphinin verglichen. Er hatte den gleichen *R<sub>f</sub>*-Wert wie Zizyphin, jedoch konnten auch noch Spuren von unmethyliertem Zizyphinin festgestellt werden. Es wurde dazu eine käufliche, mit Kieselgel HF<sub>254</sub> beschichtete Aluminiumfolie der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet. Als Laufmittel diente Benzol—Aceton (1 : 1). Zizyphin hat dann einen *R<sub>f</sub>*-Wert von 0,75, Zizyphinin von etwa 0,45.

<sup>19</sup> V. M. Ingram, J. biol. Chem. **202**, 193 (1953).