

# Discarin-I, ein neues Peptidalkaloid aus *Discaria febrifuga Martius*

Discarine-I, a New Peptide Alkaloid from *Discaria febrifuga Martius*

Peter Hennig, Ademir Morel und Wolfgang Voelter\*

Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-Chemischen Instituts  
der Universität Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 1, D-7400 Tübingen

Herrn Professor Dr. G. Braunitzer zum 60. Geburtstag gewidmet

Z. Naturforsch. **41b**, 1180–1185 (1986); eingegangen am 14. April 1986

Besides the already reported alkaloids [1–5] from the root bark extract of *Discaria febrifuga Martius*, two further peptide alkaloids, the known discarine-B and discarine-I are isolated and their structures elucidated. Discarine-I is a fourteen-membered ring peptide alkaloid and the ring is constituted by *p*-hydroxy styrylamine,  $\beta$ -hydroxyleucine, N-methylsoleucine and tryptophan.

In früheren Mitteilungen [1–5] haben wir die Isolierung und Strukturaufklärung von 10 Peptidalkaloiden aus der Wurzelrinde von *Discaria febrifuga* beschrieben. Aus dem Rohbasengemisch einer in Livramento (Brasilien) gesammelten Droge konnten wir nun durch mehrstufige Säulen- und präparative Schichtchromatographie die Nebenalkaloide Discarin-I (Abb. 1) und das bereits bekannte Discarin-B isolieren.

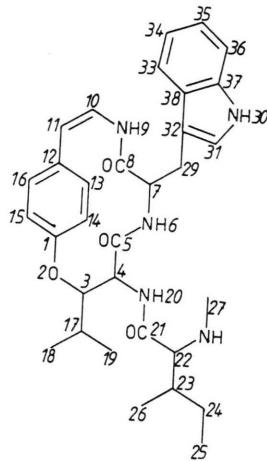


Abb. 1. Struktur von Discarin-I.

Discarin-I gehört zu den Cyclopeptidalkaloiden mit einem 14-gliedrigen, durch eine Etherbrücke geschlossenen Ring. Der Ringaufbau ist analog dem

von Discarin-B, nur die N-terminale Aminosäure ist monomethyliert.

## Massenspektrometrie und Elementaranalyse

Die Struktur von Discarin-I lässt sich aus seinem Massenspektrum (Abb. 2) auf der Grundlage des für Alkaloide dieses Typs entwickelten Fragmentierungsschemas [6] ableiten. Durch Elementaranalyse und das Molekülion  $m/z = 559$  des Massenspektrums wurde die Summenformel  $C_{32}H_{41}N_5O_4$  ermittelt.

Das Massenspektrum dieses Peptidalkaloids ist durch den äußerst intensiven Basispeak  $m/z = 100$  gekennzeichnet, der durch das „Aminfragment“ a des endständigen N-Methylsoleucins gebildet wird. Der Massenpeak  $m/z = 69$  entsteht durch Mc-Lafferty-Umlagerung aus diesem Fragment. Die Ionen  $m/z = 71$  und  $57$ , die in Folgereaktion von a entstehen, bestätigen N-Methylsoleucin als N-terminale Aminosäure. Das zu a komplementäre Fragment b mit der Masse  $m/z = 502$  beweist die Monomethylierung von N-Methylsoleucin. Durch Sekundärreaktionen von b werden 2 weitere Bruchstücke gebildet (Fragmente c und d).

Die für die Strukturermittlung bedeutsamsten Fragment-Ionen werden durch Öffnung des Ringsystems am Ethersauerstoff und den nachfolgenden, dem Zerfall linearer Peptide analogen, stufenweisen Abbau an den Amidgruppen gebildet.

Eine Homolyse der dem Ethersauerstoff benachbarten C–C-Bindung führt zu dem Oxonium-Ion f, und die für Phenolether typische Spaltung in Olefin- und Phenol-Ion ergibt das Fragment i. Die Fragmente e und h [6] sind im Massenspektrum nicht zu identifizieren, es tritt aber das Fragment h-HNCO

\* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Voelter.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0340-5087/86/0900-1180/\$ 01.00/0

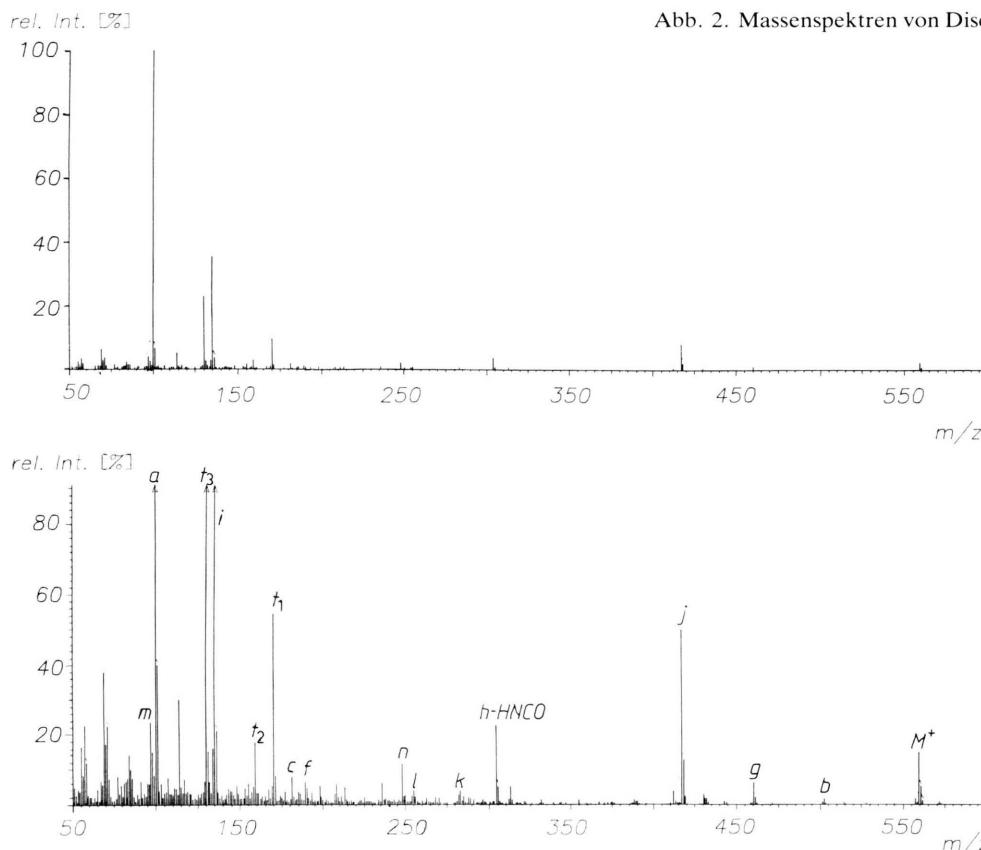
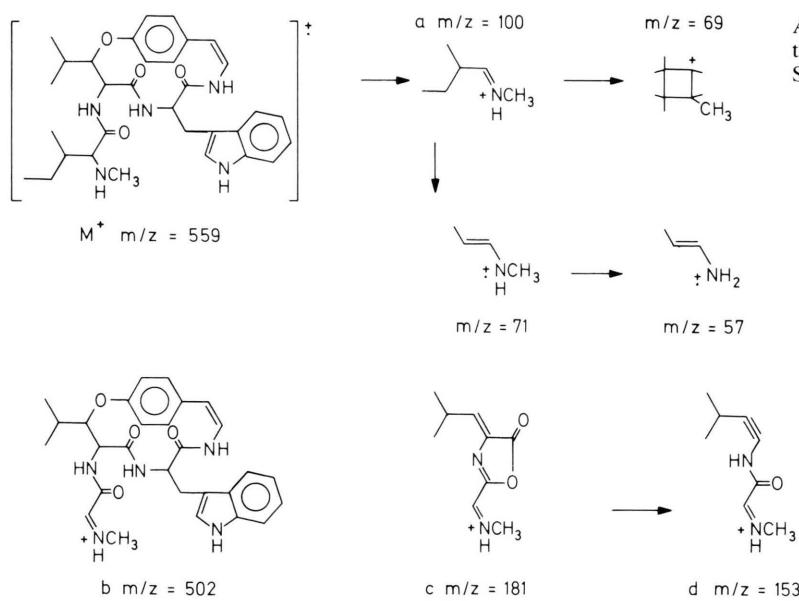


Abb. 2. Massenspektren von Discarin-I; 70 eV, 200 °C.

Abb. 3. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen der  $\alpha$ -Spaltung von Discarin-I.

mit der Masse  $m/z = 304$  auf. Dieser Massenpeak wurde auch schon bei anderen Alkaloiden mit Tryptophan [7] als ringständige Aminosäure gefunden.

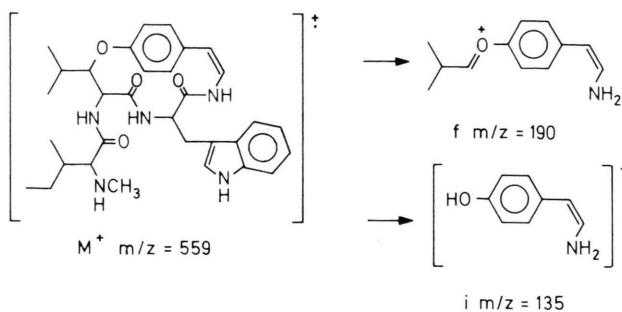


Abb. 4. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die durch Ringöffnungsreaktionen von Discarin-I entstehen.

Eine andere Reaktionsfolge wird durch die sukzessive Abspaltung der Seitenkette eingeleitet, die über die Formamid-Zwischenstufe g zu j führt. In einer Reihe von Sekundärreaktionen liefert das offenkettige Ion j die Bruchstücke k bis m.

Die einzelnen „Untereinheiten“ des Moleküls erkennt man an den Ionen a, i und m, sowie an den für

die ringständige Aminosäure Tryptophan typischen Fragmenten t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> und t<sub>3</sub>.

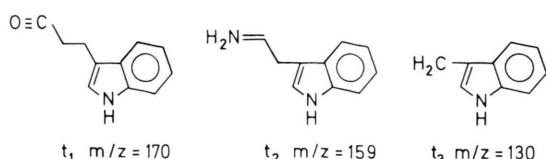


Abb. 6. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die aus dem Tryptophanrest von Discarin-I entstehen.

Für die Konstitution des 14-gliedrigen Ringsystems sind besonders die folgenden Ionen aufschlußreich: f zeigt, welche Aminosäure mit dem *p*-Hydroxystyrylamin über den Sauerstoff verknüpft ist; h-HNCO und k (sowie l), die jeweils beide am Ringsystem beteiligte Aminosäuren enthalten, einmal direkt miteinander, das andere Mal über das *p*-Hydroxystyrylamin verknüpft, beweisen Größe und Anordnung des Ringsystems. Diese massenspektrometrischen Fragmentierungen lassen die Verknüpfung der Aminosäuren  $\beta$ -Hydroxyleucin, N-Methylisoleucin und Tryptophan mit *p*-Hydroxystyrylamin zu einem 14-gliedrigen Ringsystem erkennen.

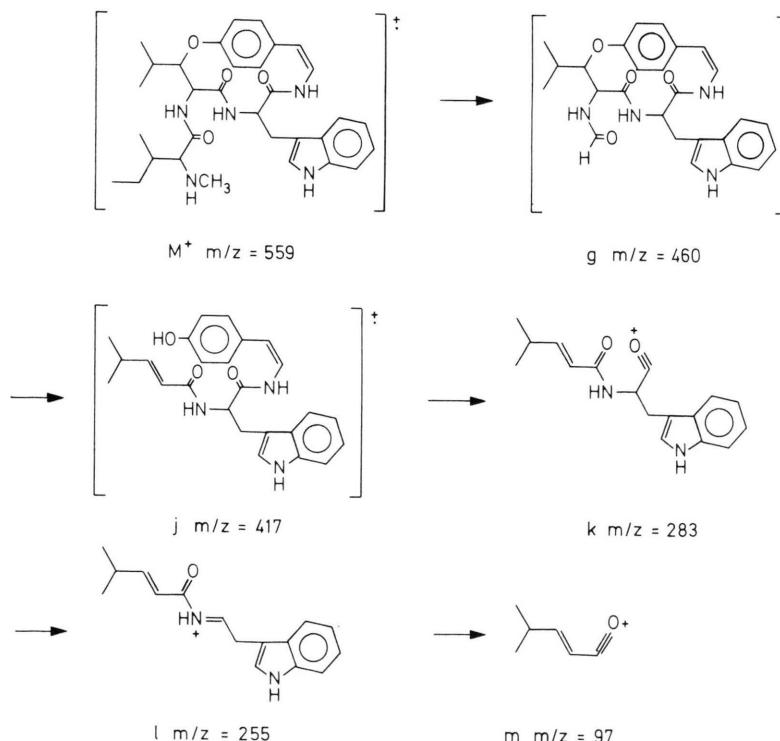


Abb. 5. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die durch den stufenweisen Abbau der Seitenkette von Discarin-I entstehen.

### <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Das 400-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abb. 7) wurde in  $\text{CDCl}_3$  mit 20%  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommen. Durch den hohen Anteil an  $\text{CD}_3\text{OD}$  wurden alle Amidprotonen ausgetauscht.

Das Spektrum zeigt zwischen 0,6 und 1,2 ppm den Signalkomplex der Methylgruppen. Die Methylgruppen des N-Methylisoleucins treten als Dublett bei  $\delta = 0,80$  ppm und als Triplet bei  $\delta = 0,83$  ppm mit je einer Kopplungskonstante von  $J = 7$  Hz in Resonanz. Durch die verschiedenen Signalmultiplizitäten lassen sich die beiden Methylgruppen eindeutig zuordnen:  $\text{CH}_3$ -(26) bei 0,80 ppm und  $\text{CH}_3$ -(25) bei 0,83 ppm. Die beiden diastereotopen Methylgruppen des  $\beta$ -Hydroxyleucins  $\text{CH}_3$ -(18) und  $\text{CH}_3$ -(19) besitzen deutlich verschiedene Resonanzfrequenzen.  $\text{CH}_3$ -(18) erscheint bei 0,92 ppm als Dublett,  $\text{CH}_3$ -(19) bei 1,16 ppm ebenfalls als Dublett. Die Kopplungskonstanten betragen bei beiden Dubletts  $J = 7$  Hz. Die Integrationskurve des Singulets bei 1,88 ppm ergibt 3 Protonen, es ist der Methylgruppe  $\text{CH}_3$ -(27) am Stickstoff des N-Methylisoleucins zuzuordnen. Im Bereich von 4,0 bis 5,0 ppm liegen weitere für 14-gliedrige Peptidalkaloide typische Signalgruppen. Bei 4,20 ppm erscheint das Signal des Protons an  $\text{CH}$ -(7) als Triplet mit  $J = 7$  Hz. Dieses Triplet entsteht durch die Kopplung mit den beiden Protonen an  $\text{CH}_2$ -(29). Die Kopplung mit  $\text{NH}$ -(6) ist durch den Deuterium-Austausch nicht sichtbar. Die Protonen des  $\beta$ -Hydroxyleucins, deren Signale die Verknüpfung mit der N-Methylaminosäure bestätigen, erscheinen bei  $\delta = 4,42$  ppm und  $\delta = 4,78$  ppm. Das

$\alpha$ -Proton  $\text{CH}$ -(4) koppelt hier nur mit dem  $\beta$ -Proton mit  $J = 8$  Hz, da der benachbarte Amid-Wasserstoff bereits ausgetauscht ist. Das  $\beta$ -Proton  $\text{CH}$ -(3) erscheint als Doppeldublett auf Grund der Kopplung von 8 Hz zum  $\alpha$ -Proton und 2 Hz zum  $\gamma$ -Proton  $\text{CH}$ -(17).

Zwischen  $\delta = 6,1$  und 6,7 ppm findet man die beiden olefinischen Protonensignale. Das Proton an  $\text{CH}$ -(11) tritt bei  $\delta = 6,14$  ppm als Dublett mit  $J = 7$  Hz in Resonanz. Das Dublett bei  $\delta = 6,60$  ppm ist dem Proton an  $\text{CH}$ -(10) zuzuordnen. Zwischen 6,8 und 7,5 ppm befinden sich die Signale der 9 aromatischen Protonen des *p*-Hydroxystyrylamins und des Tryptophans. Eine eindeutige Zuordnung ist wegen der starken Überlagerung nicht möglich.

Tab. I. <sup>1</sup>H-NMR-Daten von Discarin-I.

Wasserstoff an C-Atom Nr.	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungs- konstante [Hz]
3	4,78	dd 8; 2
4	4,42	d 8
7	4,20	t 7
10	6,60	d 7
11	6,14	d 7
17	2,00	m -
18	0,92	d 7
19	1,12	d 7
22	2,62	d 5
25	0,83	t 7
26	0,80	d 7
27	1,88	s -
33	7,43	d 8
36	7,27	d 8

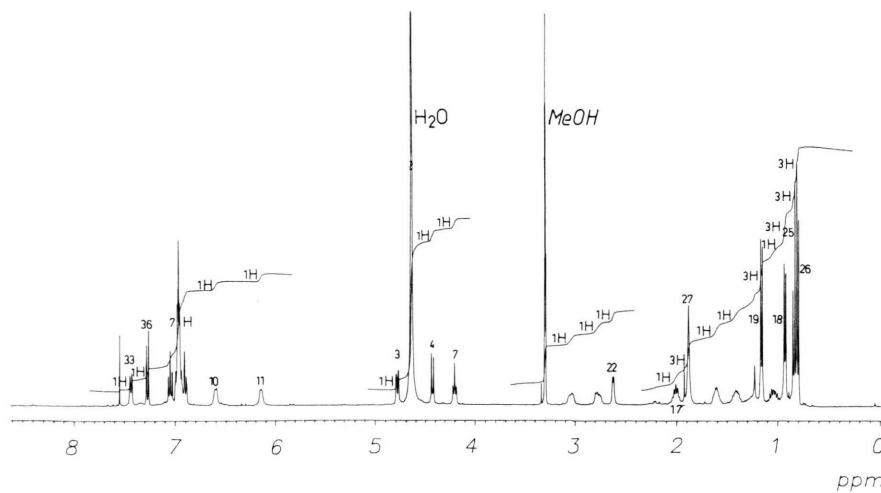


Abb. 7. 400-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Discarin-I, aufgenommen in  $\text{CDCl}_3 + 20\%$   $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie

Das 100-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (Abb. 8) wurde in <sup>12</sup>C-CDCl<sub>3</sub> mit 1% CD<sub>3</sub>OD aufgenommen. Die Resonanzsignale werden folgendermaßen zugeordnet:

Tab. II. <sup>13</sup>C-NMR-Daten von Discarin-I.

C-Atom Nr.	Chemische Verschiebung [ppm]
1	156,2
3	81,5
4	55,3
5	171,6
7	54,5
8	168,1
10	131,2
11	129,7
12	136,1
17	29,1
18	14,7
19	20,2
21	172,4
22	69,0
23	35,0
24	25,1
25	11,6
26	15,6
27	37,7
29	29,6
32	109,4
36	111,0
37	136,3
38	126,9

Die aromatischen Resonanzen liegen zwischen 115 ppm und 130 ppm und sind wegen der breiten Peakform nicht genau zuzuordnen.

### UV-Spektroskopie

Im UV-Spektrum (Abb. 9) von Discarin-I sprechen die Absorptionsbanden bei  $\lambda = 227,5, 270, 278$  und 289 nm für Tryptophan als Molekülbaustein. Dieser intensiv absorbierende Chromophor überdeckt die Absorptionsbanden des *p*-Aryloxy- und Aromaten-Chromophors. Der Styrylamin-Chromophor führt zu einer starken Aromatenendabsorption.

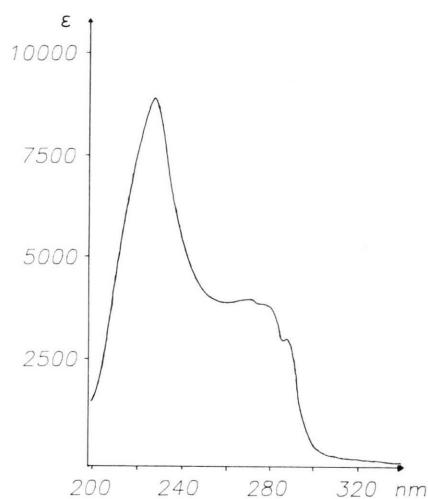


Abb. 9. UV-Spektrum von Discarin-I in Methanol.

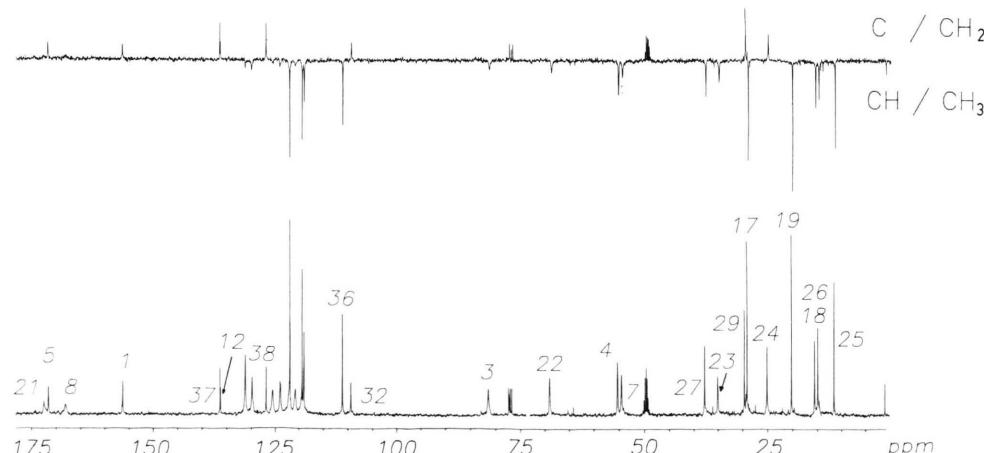


Abb. 8. 100-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren von Discarin-I, aufgenommen in CDCl<sub>3</sub> + 1% CD<sub>3</sub>OD. Unten: Protonenbreitbandentkoppelt; oben: Spin-Echo-Experiment.

### IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum von Discarin-I ähnelt dem der anderen Peptidalkaloide [6]. Es zeigt typische Bänder für sekundäre Amide ( $3400, 1690\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ ), einer N-Methylgruppe ( $2800\text{ cm}^{-1}$ ) und einer Phenol-ether-Gruppierung ( $1230\text{ cm}^{-1}$ ).

### Experimenteller Teil

Der Schmelzpunkt wurde mit einer Büchi-510-Schmelzpunktapparatur, die optische Drehung mit einem Zeiss-OLD-5-Polarimeter bestimmt. Zur Aufnahme der Spektren wurden folgende Geräte verwendet: Varian MAT 711 (MS), Bruker WM 400 (NMR), Beckmann Accu-Lab 4 (IR) und Beckmann-Spektralphotometer Modell 24 (UV). Die Elementaranalyse wurde mit einem Perkin-Elmer-240-B-Analysator, die Aminosäureanalyse mit einem Liquimat-3-Analysator der Firma Kontron durchgeführt.

Isolierung und Auf trennung der Rohalkaloide: 10 kg getrocknete Rinde wurde fein gemahlen und in

500-g-Portionen in einer Soxhlet-Apparatur mit Methanol extrahiert. Der tiefrote Methanolextrakt wurde eingeengt, in Wasser suspendiert und mit 2 N Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Nach fünfmaligem Ausschütteln mit je 2 l Ether wurde die wässrige Phase abgetrennt und mit konzentrierter Ammoniaklösung auf pH 9 eingestellt. Die basische Lösung wurde ebenfalls fünfmal mit je 2 l Ether extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Ethers im Vakuum erhielt man aus dem basischen Extrakt 10 g (= 0,1%) des leicht gelblichen Rohalkaloidgemisches. Dieses wurde durch Säulenchromatographie vorgetrennt. Als Elutionsmittel diente Chloroform, dem gradientenförmig 0 bis 0,5% Methanol zugesetzt wurde. Die Fraktionen, welche Discarin-I enthielten, wurden mittels mehrfacher Schichtchromatographie in den Systemen Chloroform/Ethylacetat und Chloroform/Ethylacetat/Aceton (2:1:2) aufgetrennt. Dabei fiel Discarin-I als nadelförmiges Produkt in einer Menge von 12 mg an;  $[\alpha]_D^{25}-149^\circ$  (0,1% in  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Schmelzpunkt 140 °C.

Wir danken dem Verband der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

- 
- [1] M. Digel, A. Morel, H. Layer, J. Biermann und W. Voelter, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **364**, 1641 (1983).
  - [2] R. Herzog, A. Morel, J. Biermann und W. Voelter, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **365**, 1351 (1984).
  - [3] R. Herzog, A. Morel, J. Biermann und W. Voelter, *Chem.-Ztg.* **108**, 406 (1984).
  - [4] A. Morel, R. Herzog und W. Voelter, *Chimia* **4**, 98 (1985).
  - [5] A. Morel, R. Herzog, J. Biermann und W. Voelter, *Z. Naturforsch.* **39b**, 1825 (1984).
  - [6] H.-W. Fehlhaber, *Z. Anal. Chem.* **235**, 91 (1968).
  - [7] R. Tschesche und E. U. Kaußmann, *The Alkaloids*, Band 15, 165, Academic Press, New York 1975.