

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, β -hydroxyleucine, N-methylisoleucine 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.

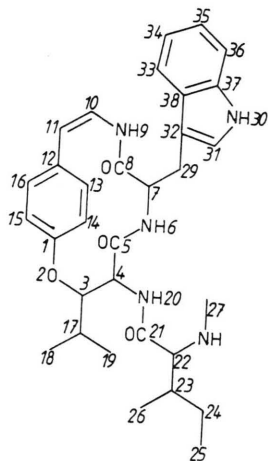


Abb. 1. Struktur von Discarin-I.

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.

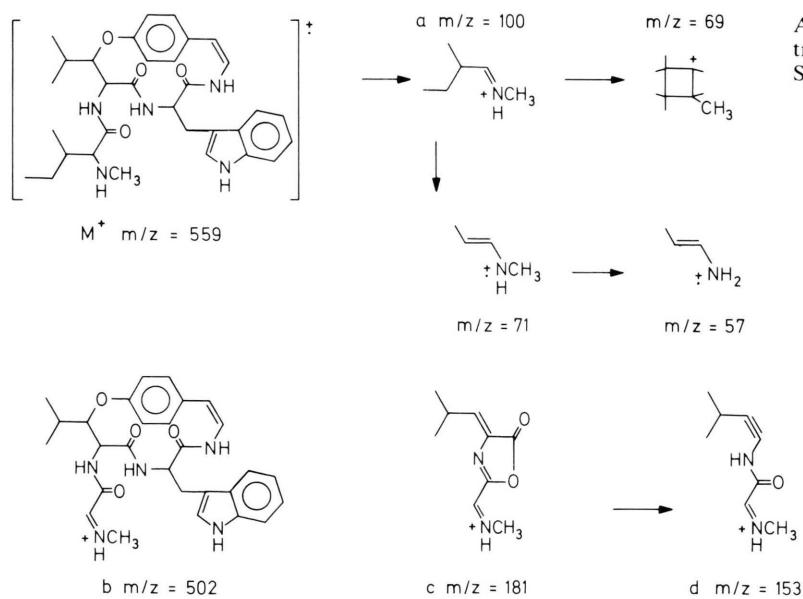
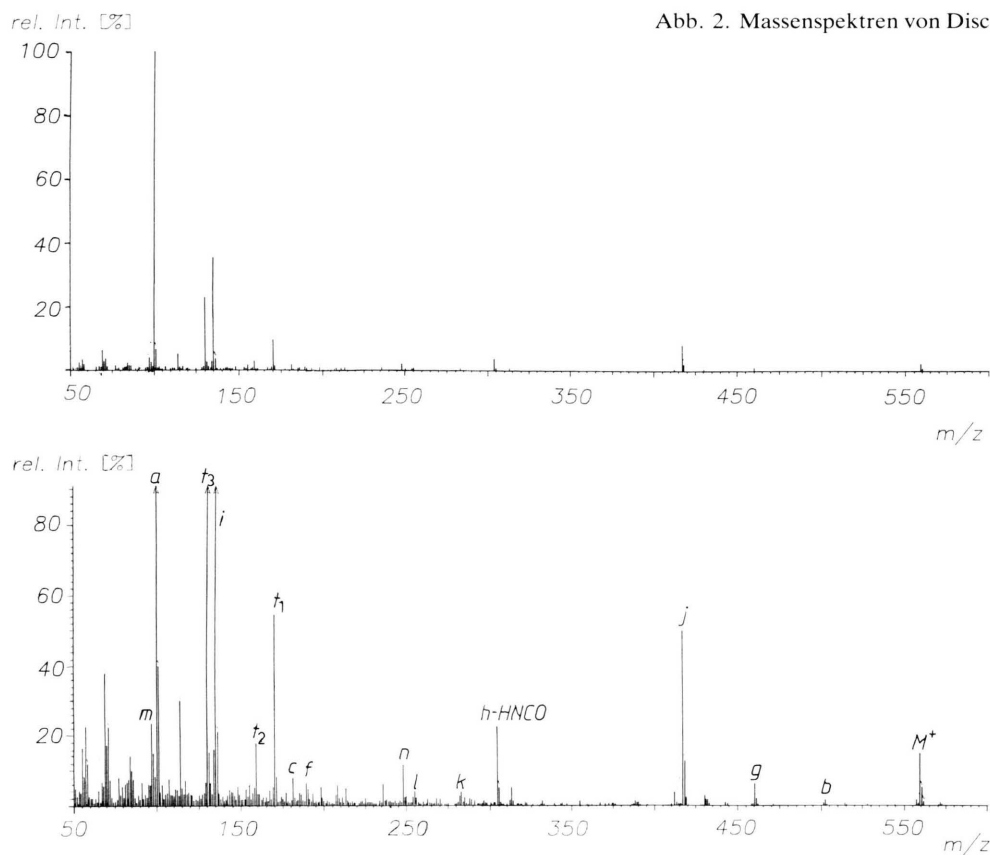
Das Massenspektrum dieses Peptidalkaloids ist durch den äußerst intensiven Basispeak $m/z = 100$ gekennzeichnet, der durch das „Aminfragment“ a des endständigen N-Methylisoleucins gebildet wird. Der Massenpeak $m/z = 69$ entsteht durch Mc-Lafferty-Umlagerung aus diesem Fragment. Die Ionen $m/z = 71$ und 57, die in Folgereaktion von a entstehen, bestätigen N-Methylisoleucin als N-terminale Aminosäure. Das zu a komplementäre Fragment b mit der Masse $m/z = 502$ beweist die Monomethylierung von N-Methylisoleucin. 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 Phenoether 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

* Sonderdruckeranforderungen an Prof. Dr. W. Voelter.

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

Abb. 3. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen der α -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.

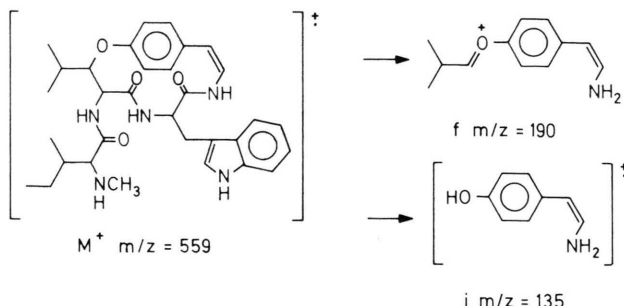


Abb. 4. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die durch Ringöffnungsreaktionen von Discarin-I entstehen.

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_1 , t_2 und t_3 .

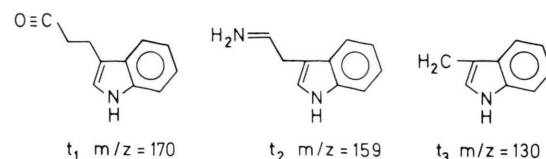


Abb. 6. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die aus dem Tryptophanrest von Discarin-I entstehen.

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 β -Hydroxyleucin, N-Methylisoleucin und Tryptophan mit *p*-Hydroxystyrylamin zu einem 14-gliedrigen Ringsystem erkennen.

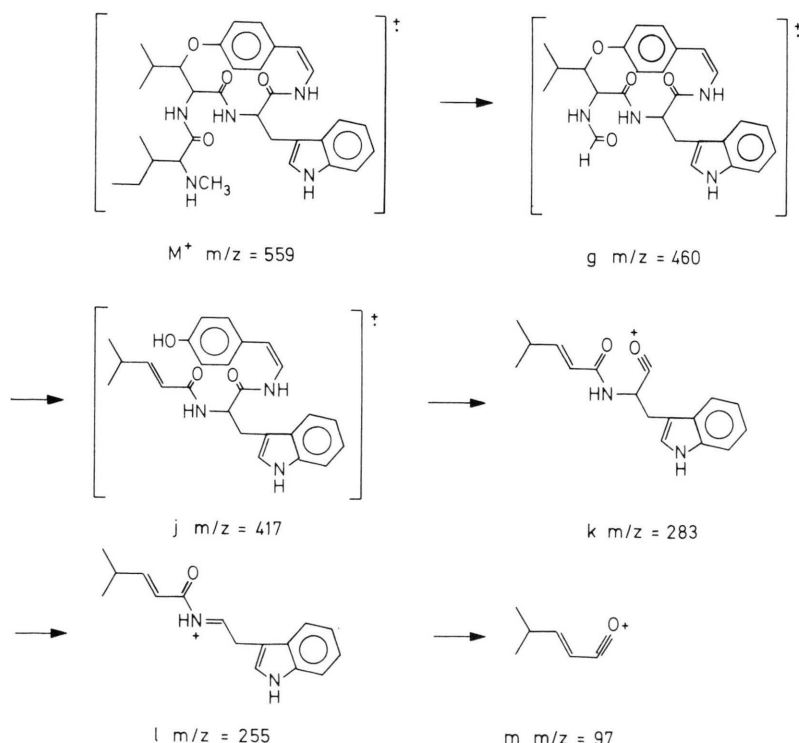


Abb. 5. Interpretation der massenspektrometrischen Fragment-Ionen, die durch den stufenweisen Abbau der Seitenkette von Discarin-I entstehen.

¹H-NMR-Spektroskopie

Das 400-MHz-¹H-NMR-Spektrum (Abb. 7) wurde in CDCl₃ mit 20% CD₃OD aufgenommen. Durch den hohen Anteil an CD₃OD wurden alle Amidprotonen ausgetauscht.

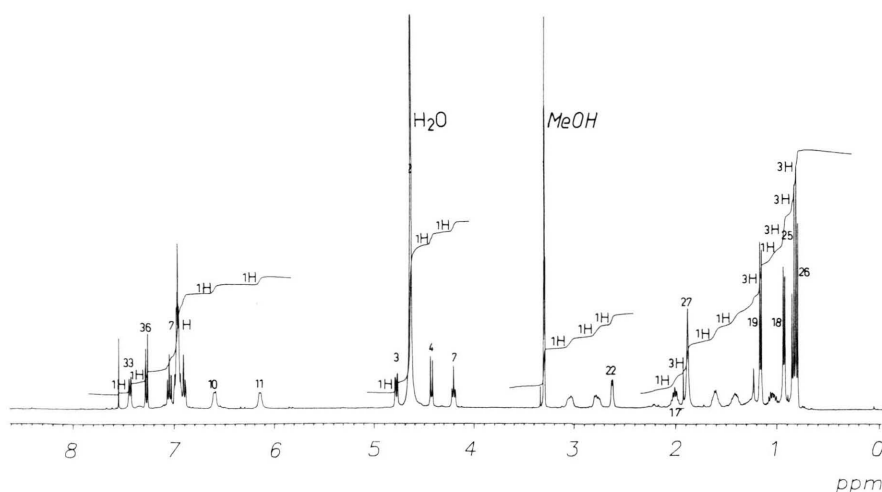
Das Spektrum zeigt zwischen 0,6 und 1,2 ppm den Signalkomplex der Methylgruppen. Die Methylgruppen des N-Methylisoleucins treten als Dublett bei $\delta = 0,80$ ppm und als Triplet bei $\delta = 0,83$ ppm mit je einer Kopplungskonstante von $J = 7$ Hz in Resonanz. Durch die verschiedenen Signalmultiplizitäten lassen sich die beiden Methylgruppen eindeutig zuordnen: CH₃-(26) bei 0,80 ppm und CH₃-(25) bei 0,83 ppm. Die beiden diastereotopen Methylgruppen des β -Hydroxyleucins CH₃-(18) und CH₃-(19) besitzen deutlich verschiedene Resonanzfrequenzen. CH₃-(18) erscheint bei 0,92 ppm als Dublett, CH₃-(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 CH₃-(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 CH-(7) als Triplet mit $J = 7$ Hz. Dieses Triplet entsteht durch die Kopplung mit den beiden Protonen an CH₂-(29). Die Kopplung mit NH-(6) ist durch den Deuterium-Austausch nicht sichtbar. Die Protonen des β -Hydroxyleucins, deren Signale die Verknüpfung mit der N-Methylamino-säure bestätigen, erscheinen bei $\delta = 4,42$ ppm und $\delta = 4,78$ ppm. Das

α -Proton CH-(4) koppelt hier nur mit dem β -Proton mit $J = 8$ Hz, da der benachbarte Amid-Wasserstoff bereits ausgetauscht ist. Das β -Proton CH-(3) erscheint als Doppeldublett auf Grund der Kopplung von 8 Hz zum α -Proton und 2 Hz zum γ -Proton CH-(17).

Zwischen $\delta = 6,1$ und 6,7 ppm findet man die beiden olefinischen Protonensignale. Das Proton an 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 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. ¹H-NMR-Daten von Discarin-I.

Wasserstoff an C-Atom Nr.	Chemische Verschiebung [ppm]	Kopplungskonstante [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-¹H-NMR-Spektrum von Discarin-I, aufgenommen in CDCl₃ + 20% CD₃OD.

^{13}C -NMR-Spektroskopie

Das 100-MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 8) wurde in ^{12}C - CDCl_3 mit 1% CD_3OD aufgenommen. Die Resonanzsignale werden folgendermaßen zugeordnet:

Tab. II. ^{13}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.

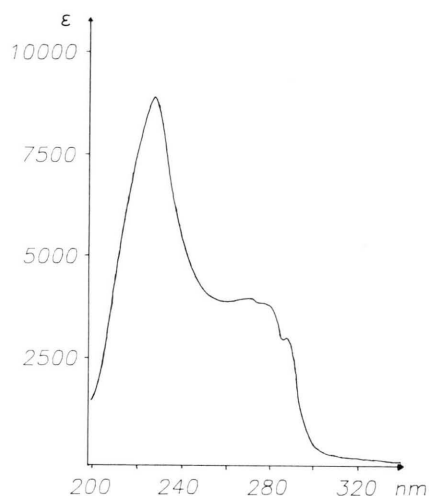
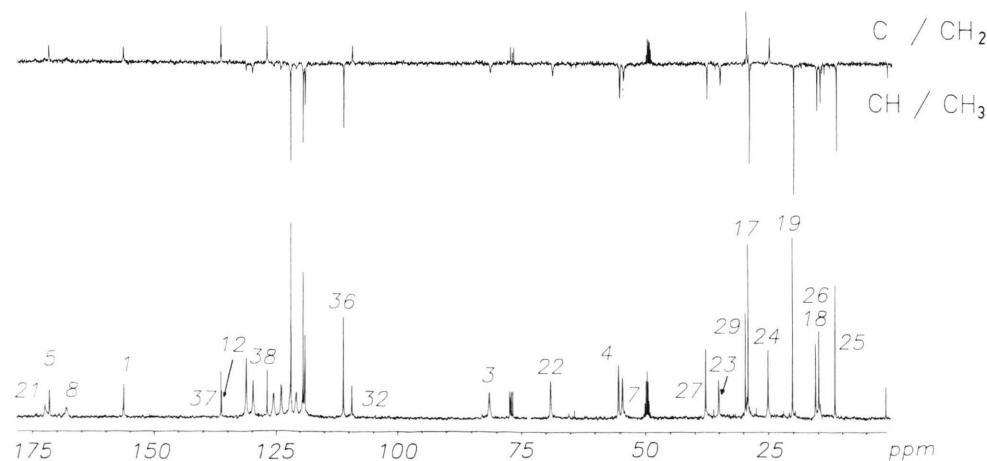


Abb. 9. UV-Spektrum von Discarin-I in Methanol.

Abb. 8. 100-MHz- ^{13}C -NMR-Spektren von Discarin-I, aufgenommen in $\text{CDCl}_3 + 1\% \text{CD}_3\text{OD}$. Unten: Protonenbreitbandenkoppelt; oben: Spin-Echo-Experiment.

IR-Spektroskopie

Das IR-Spektrum von Discarin-I ähnelt dem der anderen Peptidalkaloide [6]. Es zeigt typische Banden für sekundäre Amide (3400 , 1690 – 1650 cm^{-1}), einer N-Methylgruppe (2800 cm^{-1}) und einer Phenol-ether-Gruppierung (1230 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 Auftrennung 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 eingengt, 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 nadelartiges Produkt in einer Menge von 12 mg an; $[\alpha]_D^{25}$ -149° (0,1% in CH_3OH), 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.