

[Chem. Pharm. Bull.]
[32(9)3584—3587(1984)]

Über die Bestandteile der chinesischen Droge "Ti-ku-'pi." I. Isolierung und Konstitution von Lyciumamid, einem neuen Dipeptid¹⁾

MAMORU NOGUCHI,^{a,2)} KENSU MOCHIDA,^a TETURO SHINGU,^b
MUTSUO KOZUKA,^{*,c} und KAZUYOSHI FUJITANI^c

Staatliches Institut für Hygiene, Zweigstelle Osaka,^a 1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku,
Osaka 540, Japan, Pharmazeutische Fakultät der Kobe-Gakuin Universität,^b
Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 673, Japan, und Pharmazeutische
Hochschule Kyoto,^c Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku,
Kyoto 607, Japan

(Eingegangen am 6. Februar 1984)

A new dipeptide, lyciumamide (1), was isolated from the Chinese crude drug "Ti-ku-'pi," root bark of *Lycium chinense* MILL. (Solanaceae), and was shown by spectroscopy, chemical degradation, and synthesis to be *N*-benzoyl-L-phenylalanyl-L-phenylalaninol *O*-acetate (1).

Keywords—dipeptide; lyciumamide; Ti-ku-'pi; *Lycium chinense*; Solanaceae; structure determination; ¹H-NMR; MS; degradation; synthesis

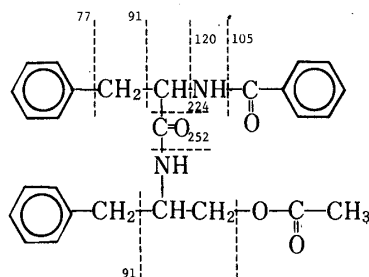
Über die Bestandteile von Wurzelrinde des *Lycium chinense* MILL. (Ti-ku-'pi) liegen nur wenige Untersuchungen vor. Betain,³⁾ Linolsäure,³⁾ β -Sitosterin,⁴⁾ Melissinsäure,⁴⁾ Linolensäure,⁴⁾ und Kukoamin⁵⁾ wurden aus der Wurzelrinde isoliert. In der vorliegenden Arbeit werden die Isolierung von Lyciumamid (1), einem neuen Dipeptid, aus "Ti-ku-'pi" (*Lycii Radicis Cortex*) und die Ermittlung seiner Struktur beschrieben.

Die Droge wurde mit 50% Äthanol extrahiert. Der Extrakt wurde, wie im experimentellen Teil beschrieben, aufgearbeitet und ein neues Dipeptid, das wir als Lyciumamid bezeichneten, wurde in kleiner Menge gewonnen.

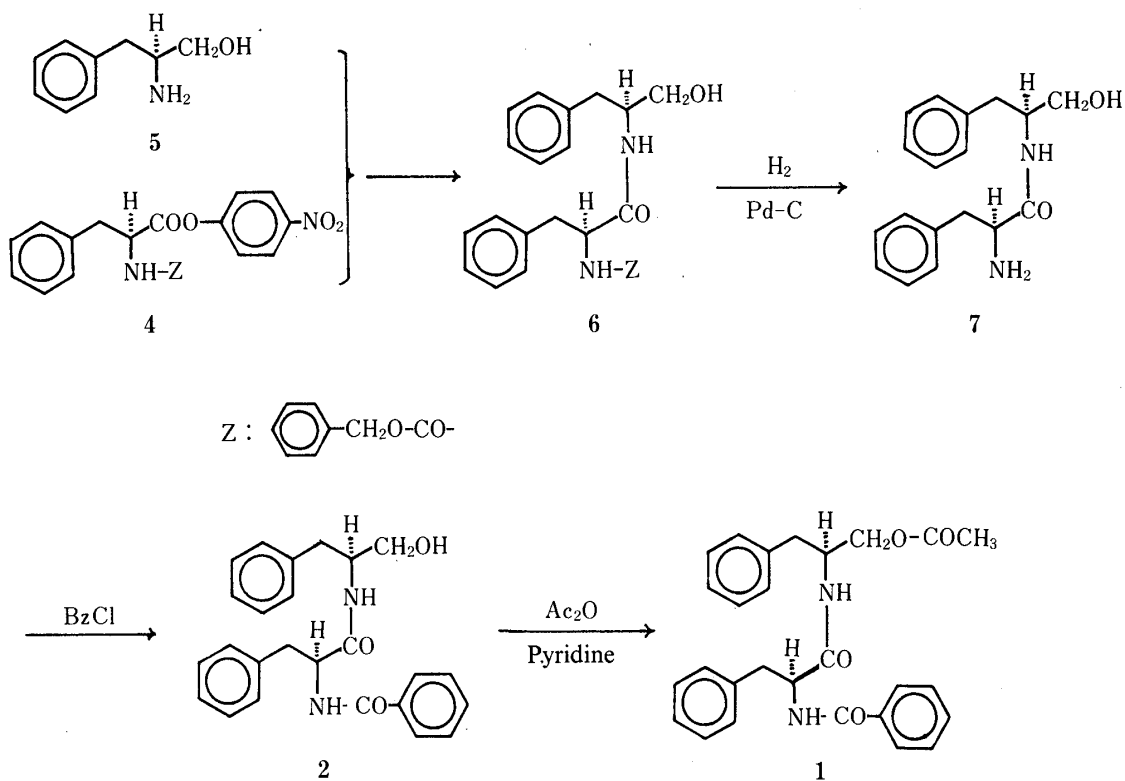
Lyciumamid (1) ist eine farblose Verbindung von den doppelten Schmelzpunkten 181—182 °C und 189—190 °C, der Summenformel C₂₇H₂₈N₂O₄, und der spezifische Drehung [α]_D −40° (Methanol). Diese Substanz zeigt keine Färbung mit Dragendorff-Reagens. Im Infrarotspektrum (IR) von 1 zeigt sich eine NH-Bande bei 3330 cm^{−1}, eine Carbonyl-Bande der Estercarbonylgruppe bei 1740 cm^{−1}, und zwei Carbonyl-Banden der Säureamidgruppen bei je 1675 und 1645 cm^{−1}. Im Protonenresonanzspektrum (¹H-NMR) erscheinen das Methyl-Singulett der Acetylgruppe bei δ 2.00 und das Multiplett, das bei δ 3.88 zentriert (AB-Teil des ABX-Systems) und den Methylen-Protonen der CH₂OAc-Gruppe entspricht. Auf Grund der Beobachtung des Nuklear-Overhauser-Effekts durch Einstrahlung bei δ 7.10 sowie 7.20, wurden die Dubletten bei δ 2.75 zentriert und bei δ 3.15 (je 2H, AB-Teil des ABX-Systems) als Benzyl-Methylen-Gruppen zugeordnet. Zwei verbreiterte Dubletten, zentriert bei δ 6.21 und 6.86, die nach Zugabe von D₂O und nach 24-stündigem Stehenlassen verschwinden, sind Amidprotonen zuzuordnen. Fünf Protonen der Benzoylgruppe finden sich im Bereich von δ 7.30—7.80 als A₃B₂-System. Durch Proton-Einstrahlung bei δ 4.35 (Multiplett) werden die Protonen bei δ 2.75, 3.88, und 6.21 in Singulett umgewandelt. Ferner verwandelt Proton-Einstrahlung bei δ 4.88 das Multiplett bei δ 3.15 in ein einfacheres Multiplett und das verbreiterte Dublett bei δ 6.86 in ein Singulett. Dies erlaubt die Annahme, dass die Verbindung 1 zwei Sequenzen, Ph-CH₂-CH(-NHCO)- und Ph-CH₂-CH(-NHCO)-

CH_2 - besitzt.

Hydrolyse von **1** mit methanolischem Natriumbicarbonat lieferte Deacetyllyciumamid (**2**). Mit äthanolischem Kaliumhydroxyd ergab die Hydrolyse *N*-Benzoylphenylalanin (**3**) neben **2**.



Schema 1. Struktur des Lysiumamid und sein Fragmentierungsmuster



Schema 2

Die besprochenen spektrometrischen und chemischen Untersuchungen von **1** führen zur Formel **1** für dieses Dipeptid.

Dieselbe Konstitution für **1** ergibt sich auch aus der Analyse der Massenspektren. Im Massenspektrum von **1** erscheinen der Molekül-Peak (M^+ , m/z 444) und Fragment-Peaks bei m/z 384 sowie m/z 353. Daneben zeigte **1** charakteristische Peaks bei m/z 323, 311, 293, 269, 252, 224 sowie 190, die auch im Massenspektrum von **2** gefunden werden können. Ionen bei m/z 252 und 224 wurden auch im Massenspektrum von **3** gefunden. Peaks bei m/z 147, 131, 120 sowie 105 finden sich in den Massenspektren von **1**, **2**, und **3**, wobei demjenigen bei m/z 131 das Ion $(\text{Ph}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O})^+$ zuzuordnen ist. Auf Grund von Massenspektren der Phenylalanin enthaltenden Peptiden,⁶⁾ kann angenommen werden, dass die massenspektrometrische Fragmentierung an der gebrochenen Linie in der Struktur im Schema 1 vorkommt. Das Massenspektrum passt auf die angegebene Formel.

Hinsichtlich der Biogenese können Phenylalanin sowie Phenylalaninol in Lyciumamid L-Konfiguration besitzen. Doch war es schwierig, die Stereoformel durch Spaltsstückanalyse zu ermitteln. Darum versuchten wir die Beweisführung der Konfigurationen mit synthetischen Methoden. Das durch die Verknüpfung von *N*-Carbobenzoxy-L-Phenylalanin *p*-Nitrophenylester (4)⁷⁾ mit L-Phenylalaninol (5)⁸⁾ resultierende *N*-Carbobenzoxy-L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol (6) wurde bei katalytischer Hydrierung auf Palladium-Kohle decarbobenzoxyliert. Das dadurch entstandene L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol (7) wurde ohne weitere Reinigung mit Benzoylchlorid-Alkali behandelt und es bildete sich *N*-Benzoyl-L-Phenylalanyl-Phenylalaninol (2). Acetylierung von 2 mit Acetanhydrid-Pyridin liefert *N*-Benzoyl-L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol *O*-Acetat (1).

Der Vergleich von synthetischen 1 und natürlich vorkommendem Lyciumamid in den physikalischen Eigenschaften (Mischprobe, IR, ¹H-NMR, optische Drehung, Dünnschichtchromatographie) bewies die Identität der beiden.

Gleichzeitig mit dieser Arbeit haben Isoi und Kamisako ein Dipeptid aus *Aster tataricus* L. fil. isoliert, das als Deacetyllyciumamid identifiziert wurde.⁹⁾

Lyciumamid stellt das erste Beispiel eines in der Natur vorkommenden Dipeptid dar, das ein Phenylalanin-Phenylalaninol-Typ ist. Im Zusammenhang mit Phenylalanin-Metabolismus in höheren Pflanzen scheint dieses Resultat bemerkenswert zu sein.

Experimenteller Teil

Die IR-Spektren wurden auf einem IR-Spektrophotometer 27G von Shimadzu, die UV-Spektren auf einem Hitachi EPS-2-Gerät aufgenommen. Die ¹H-NMR-Spektren wurden auf einem Varian HA-100D mit Tetramethylsilan als internem Standard, die Massenspektren (MS) auf einem Hitachi-Massenspektrometer, Modell RMU 6E aufgenommen. Zur Messung der optischen Drehung diente uns ein Rex photoelektrisches Polarimeter NEP-2. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden mit dem Mikroheizapparat Yanaco bestimmt.

Extraktion und Fraktionierung—Getrocknete Lycii Radicis Cortex (50.5 kg), die wir von Mikuni & Co., Ltd., Osaka im Januar 1970 gekauft haben, wurden gemahlen und mit 50% Äthanol bei 60°C nach dem Perkulationsverfahren extrahiert. Der Auszug wurde unter vermindertem Druck konzentriert, die ausgefallene braune, zähflüssige Masse entfernt und die verbleibende wässrige Lösung fortlaufend mit Äther extrahiert. Der ätherische Extrakt wurde eingedampft und der dabei erhaltene Rohextrakt wurde an Kieselgel chromatographiert. Es wurde mit Petroleum Äther, Petroleum Äther-Äther (8:2), Petroleum Äther-Äther (1:1) und dann Äther eluiert. Aus den Fraktionen mit Petroleum Äther-Äther (1:1) konnte ein neues Dipeptid, das wir Lyciumamid genannt haben, isoliert werden (120 mg).

Lyciumamid (1)—Das aus Äthanol mehrfach umkristallisierte Präparat schmolz bei 181–182, 189–190°C (doppelt. Schmp.). $[\alpha]_D^{18} -40.0^\circ$ ($c=0.2$, MeOH). IR (KBr) cm^{-1} : 3330, 1740, 1675, 1645, 756, 708. $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$: Ber. C, 72.94; H, 6.35; N, 6.30. Gef. C, 72.91; H, 6.40; N, 6.37. ¹H-NMR (CDCl_3) δ ppm: 2.00 (3H, s), 2.75 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 3.15 (2H, m, $J_1=6.0$ Hz, $J_2=8.0$ Hz, $J_3=13.5$ Hz), 3.88 (2H, m, $J_1=J_2=4.6$ Hz, $J_3=11.0$ Hz), 4.35 (1H, m), 4.88 (1H, m, $J_1=J_2=8.0$ Hz, $J_3=6.0$ Hz), 6.21, 6.86 (je 1H, d), 7.10, 7.20 (je 5H, br s), 7.30–7.80 (5H, m). MS m/z (%): 444 (M^+ , 3), 384 (2), 353 (5), 323 (4), 311 (7), 293 (5), 269 (12), 252 (50), 232 (8), 224 (45), 190 (2), 176 (8), 172 (14), 147 (3), 133 (12), 131 (18), 120 (13), 105 (100).

Hydrolyse von 1 mit NaHCO_3 —Lyciumamid (1) (40 mg) wurde in der Mischung von 5 ml MeOH und 5 ml der 10% NaHCO_3 -Lösung 1,5 h unter Rückfluss gekocht. Das ausgefallene Deacetyllyciumamid (2) wurde abfiltriert und aus Äthanol umkristallisiert (15.4 mg). Nadelchen von Schmp. 179–180, 193–193.5°C (doppelt. Schmp.). $[\alpha]_D^{18} -59^\circ$ ($c=0.22$, MeOH). IR (KBr) cm^{-1} : 3310, 1660, 1632, 743, 699. ¹H-NMR ($\text{Pyridin-}d_5$) δ ppm: 3.05 (2H, m), 3.34 (2H, m), 3.82 (2H, d), 4.60 (1H, m), 5.38 (1H, m), 7.0–8.1 (15H, m), 8.73, 8.96 (je 1H, d). MS m/z (%): 384 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}^+$ (9), 323 (3), 311 (4), 293 (20), 279 (7), 269 (7), 253 (14), 252 (68), 224 (60), 197 (8), 190 (17), 183 (9), 172 (11), 169 (11), 155 (14), 148 (11), 141 (15), 134 (14), 131 (22), 127 (23), 125 (18), 120 (39), 113 (24), 111 (30), 106 (39), 105 (100).

Hydrolyse von 1 mit KOH—Lyciumamid (1) (23.8 mg) wurden auf dem Wasserbad mit 12 ml äthanolischer KOH-Lösung (3%) eine Stunde lang unter Rückfluss zum schwachen Sieden erhitzt, anschliessend mit 230 ml Wasser versetzt und mit CHCl_3 ausgezogen. Verdampfen des Lösungsmittels und Chromatographie an Al_2O_3 mit CHCl_3 des Rückstands (6.7 mg) gaben Nadelchen (Schmp. 179–180, 192–193.5°C) identifiziert als 2. Die wässrige Schicht wurde mit verd. Salzsäure angesäuert und mit CHCl_3 extrahiert. Die CHCl_3 -Phase wurde angedampft und man erhielt *N*-Benzoylphenylalanin (3)¹⁰⁾ als weisses Pulver. ¹H-NMR ($\text{Aceton-}d_6$)¹¹⁾ δ ppm: 3.27 (2H, m), 4.97 (1H, m), 7.0–8.0 (10H, m). MS m/z (%): 269 (M^+ , 9), 252 (5), 225 (25), 224 (20), 178 (7), 164 (5), 149 (7), 148 (77), 147 (100);

131 (13), 122 (43), 106 (67), 105 (81), 101 (47).

N-Carbobenzoxy-L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol (6)—*N*-Carbobenzoxy-L-Phenylalanin *p*-Nitrophenylester (4) (430 mg) wurden in 2 ml AcOEt gelöst und unter kräftigem Umschütteln mit 4 ml Lösung von 160 mg L-Phenylalaninol (5) in AcOEt versetzt und 2 h aufgerührt. Nachdem man es 12 h stehen liess, wurden 15 ml AcOEt zugesetzt und anfangs mit 0.5% Zitronensäure, dann 4% NaHCO₃-Lösung und zuletzt mit Wasser wie üblich aufgearbeitet und eingedampft. Farblose Kristalle aus Äthanol, Ausbeute 332 mg (75%). Schmp. 158.5–160.5 °C. $[\alpha]_D^{24} - 53.3^\circ$ ($c = 0.49$, MeOH). C₂₆H₂₈N₂O₄: Ber. C, 72.20; H, 6.53; N, 6.48. Gef. C, 71.78, H, 6.56; N, 6.58. IR (Nujol) cm⁻¹: 3340, 3300, 1690, 1655, 745, 700. ¹H-NMR (Pyridin-*d*₅) δ ppm: 3.15 (2H, m), 3.35 (2H, m), 3.83 (2H, d), 4.68 (1H, m), 5.05 (1H, m), 5.19 (2H, s), 7.0–7.5 (15H, m).

N-Benzoyl-L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol (2)—Aktive Kohle (Darco G 60, 100 mg) wurden mit 1 ml von 1%igem PdCl₂-Lösung versetzt und mit H₂-Gasen aktiviert. Nach dem Waschen wurde die Lösung von 6 (433 mg) in Äthanol versetzt und 10 h mit H₂-Gasen hydriert. Die äthanolische Lösung wurde filtriert und zur Austrocknung eingedampft. Der ohne weitere Reinigung in 10 ml CH₂Cl₂ gelöste Rückstand (7, 280 mg), wurde mit 4 ml 10%igem NaOH versetzt und unter Eiskühlung und Umrühren mit der wasserfreien ätherischen Lösung von 200 mg Benzoylchlorid tropfenweise hinzugefügt. Nach 4 h wurde das ausgefallene weisse Pulver abfiltriert und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 218 mg (54%, bez. auf 6), Schmp. 179–180, 193–193.5 °C (doppelt. Schmp.). $[\alpha]_D^{18} - 66^\circ$ ($c = 0.3$, MeOH). C₂₅H₂₆N₂O₃: Ber. C, 74.60; H, 6.51; N, 6.96. Gef. C, 73.98; H, 6.29; N, 6.85. IR und ¹H-NMR sowie dünnschichtchromatographische Bewegung sind identisch mit denen von Deacetyllyciumamid (2).

N-Benzoyl-L-Phenylalanyl-L-Phenylalaninol O-Acetat (1) durch Acetylierung von 2—Synthetische 2 (41 mg) wurden mit je 1 ml Acetanhydrid und Pyridin gelöst und nach dem Erwärmen auf 90 °C für eine Stunde wie üblich aufgearbeitet. Farblose Kristalle aus Äthanol, Ausbeute 26 mg (58%). Schmp. 181–182, 189–190 °C (doppelt. Schmp.). $[\alpha]_D^{20.5} - 42.8^\circ$ ($c = 0.21$, MeOH). C₂₇H₂₈N₂O₄: Ber. C, 72.94; H, 6.35; N, 6.30. Gef. C, 72.87; H, 6.45; N, 6.35. IR und ¹H-NMR sowie dünnschichtchromatographische Bewegung sind identisch mit denen von Lyciumamid (1).

Danksagung Herrn H. Asahina, Direktor Emeritus des Staatlichen Instituts für Hygiene, Zweigstelle Osaka, Herrn Professor Emeritus Dr. M. Tomita der Universität Kyoto, Herrn Prof. Dr. T. Sawada und Herrn Prof. Dr. T. Matsuno der Pharmazeutischen Hochschule Kyoto, danken wir für ihr stets förderndes Interesse, Herrn Prof. Dr. H. Yajima der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Kyoto für seine kritischen Diskussionen und wertvollen Anregungen; ferner gilt unser Dank der Maruishi Seiyaku Co. für die Preparation des Extrakts, der Takeda Chemical Industries, Ltd. und Shinonogi & Co., Ltd. für die Elementaranalyse und Herrn Dr. K. Hashimoto, an der Pharmazeutischen Hochschule Kyoto, für die Massenspektren.

Literatur und Anmerkungen

- 1) Ein Teil dieser Arbeit wurde in der 92. Jahrestagung der Pharmazeutischen Gesellschaft Japan (Higashiosaka, April 1972) vorgetragen.
- 2) Neue Adresse: Staatliche Institut für Hygiene 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan.
- 3) K. Mizobuchi, Y. Inoue, M. Nagai, und J. Higashi, *Shoyakugaku Zasshi*, **17**, 16 (1963).
- 4) K. Mizobuchi, H. Kobayashi, M. Nagai, T. Shimaoka, und J. Higashi, *Tokushima Daigaku Yakugaku Kenkyu Nempo*, **14**, 10 (1965).
- 5) S. Funayama, K. Yoshida, C. Konno, und H. Hikino, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 1355.
- 6) J. P. Kamerling, W. Heerma, Th. J. Penders, und J. F. G. Vliegthart, *Org. Mass Spectrom.*, **1**, 345 (1968); J. P. Kamerling, W. Heerma, und J. F. G. Vliegthart, *ibid.*, **1**, 351 (1968); R. T. Aplin, I. Eland, und J. H. Jones, *ibid.*, **2**, 795 (1969); A. A. Kiryushkin, H. M. Fales, T. Axenrod, E. J. Gilbert, und G. W. A. Milne, *ibid.*, **5**, 19 (1971).
- 7) M. Bodanszky und V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6072 (1959).
- 8) H. Seki, K. Koga, H. Matsuo, S. Ohki, I. Matsuo, und S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 995 (1965).
- 9) Durch die Herren Prof. K. Isoi und W. Kamisako der Mukogawa Frauenuniversität auf privatem Weg berichtet.
- 10) Die Ausbeute von 3 war ungenügend, um die Verlässlichkeit des optischen Drehungswerts festzustellen.
- 11) Käufliches *N*-Benzoyl-DL-phenylalanin wies das gleiche Spektrum auf.