

- [15] J. LEVY, J. LE MEN & M.-M. JANOT, C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 253, 131 (1961).
 [16] K. S. BROWN, JR., private Mitteilung.
 [17] H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI & D. H. WILLIAMS, «Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry», Vol. I: Alkaloids, chapters 7 & 8, Holden-Day, Inc., San Francisco 1964.
 [18] C. DJERASSI, L. D. ANTONACCIO, H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON & B. GILBERT, Tetrahedron Letters 1962, 1001.
 [19] J. P. KUTNEY & E. PIERS, J. Amer. chem. Soc. 86, 633 (1964).
 [20] H. BUDZIKIEWICZ, J. M. WILSON, C. DJERASSI, J. LEVY, J. LE MEN & M.-M. JANOT, Tetrahedron 19, 1265 (1963).
 [21] C. DJERASSI, A. A. P. G. ARCHER, T. GEORGE, B. GILBERT, J. N. SHOOLERY & L. F. JOHNSON, Experientia 16, 532 (1960).

47. Über die Inhaltsstoffe von *Zizyphus oenoplia* MILL.

2. Mitteilung¹⁾

Zur Konstitutionsermittlung des Zizyphins²⁾

von E. Zbiral³⁾, E. L. Ménard⁴⁾ und J. M. Müller⁴⁾

(13. I. 65)

In einer ersten Mitteilung¹⁾ wurde die Isolierung der basischen Peptide Zizyphin (I) und Zizyphinin aus der Wurzelrinde von *Zizyphus oenoplia* MILL., einem im tropischen Asien und Australien beheimateten Strauche beschrieben. Für die beiden Basen, welche im Mengenverhältnis von etwa 10 zu 1 vorliegen, liessen sich die Bruttoformeln $C_{33}H_{49}O_6N_5$ bzw. $C_{32}H_{47}O_6N_5$ sicherstellen. Beide verhielten sich bei der Titration und hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Salze¹⁾ wie einsäurige Basen. Chemische und physikalische Eigenschaften wiesen auf nahe strukturelle Verwandtschaft der beiden Substanzen hin. Die bei der salzsauren Hydrolyse gebildeten Aminosäuren Prolin und Isoleucin und die Ultraviolett-, Infrarot- und Protonenresonanz-Spektren¹⁾ lieferten erste Hinweise, dass es sich beim Zizyphin um eines der in höheren Pflanzen selten vorkommenden peptidischen Alkaloide handelte⁵⁾.

¹⁾ 1. Mitteilung: Isolierung der Inhaltsstoffe [1].

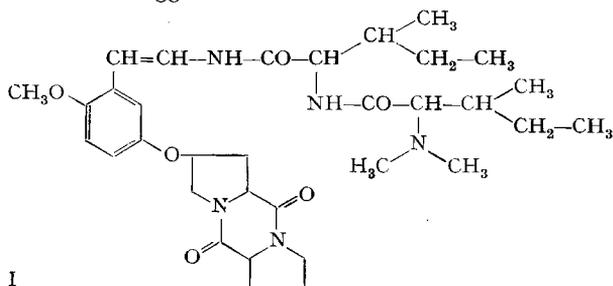
²⁾ Der eine von uns (E. Z.) hat diese Arbeit auszugsweise am österreichisch-schweizerischen Chemikertreffen in Innsbruck (3. bis 5. Oktober 1963) vorgetragen, vgl. [2]. Sie wurde zum grössten Teil im Org.-chem. Laboratorium der ETH, Zürich, ausgeführt. Die abschliessenden Ergebnisse wurden am Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien erhalten.

³⁾ Gegenwärtige Adresse: Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien.

⁴⁾ CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel.

⁵⁾ Wir haben seinerzeit Zizyphin [1] als basisches Peptid bezeichnet. Da aber diese Bezeichnung in der Peptidchemie schon für Körper, die nur aus Aminosäuren aufgebaut sind, gebraucht wird, scheint uns heute die inzwischen von PAÏS *et al.* [3] für das Pandamin vorgeschlagene Bezeichnung «*peptidisches Alkaloid*» besser den tatsächlichen Verhältnissen zu entsprechen. Obschon Zizyphin keine für klassische Alkaloide typische Teilstruktur aufweist, enthält es doch die Styrolamingruppierung, eine mögliche biogenetische Vorstufe des Indols. Andererseits besitzt auch die Bezeichnung «*heterodetes Peptid*», die aus der Peptidnomenklatur stammt [4] und schon früher z. B. für Ergotamin [5] und Phalloidin [6] angewendet wurde, eine gewisse Berechtigung.

Die chemische Konstitution des Zizyphins, die in dieser Arbeit abgeleitet wird, sei hier mit der Formel I vorweggenommen.



Das *Ultraviolett-Spektrum* (Fig. 1) besitzt zwei Maxima, deren Lage und Extinktionswerte für eine Styrol-Gruppierung charakteristisch sind. Dieses Kennzeichen verschwindet bei der katalytischen Hydrierung und wir finden beim *Dihydrozizyphin* (II) nur noch ein vielen Hydrochinoäthern [7] gemeinsames Maximum bei 290 nm^{μ} ($\log. \epsilon = 3,47$) (Fig. 2).

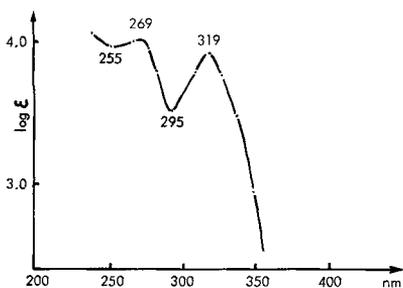


Fig. 1. UV.-Absorptionsspektrum des Oxalates von I (in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

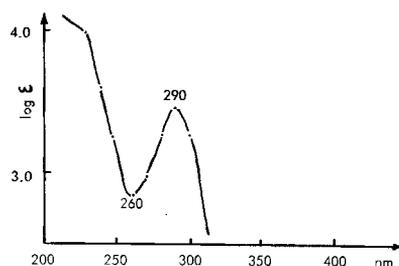


Fig. 2. UV.-Absorptionsspektrum des Oxalates von Dihydrozizyphin (II) (in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

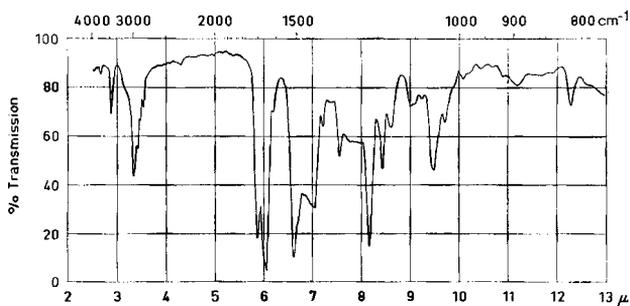
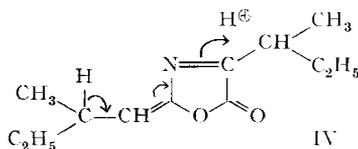


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von I (in CH_2Cl_2)

Das *Infrarot-Spektrum* (Fig. 3) zeigt eine ausgeprägte Bande bei 3500 cm^{-1} ($-\text{NH}-$), eine strukturierte Bande im Bereich der CH-Absorption (3000 cm^{-1}) ein komplexes Bandensystem im Bereich der Carbonylabsorption ($1670\text{--}1703\text{ cm}^{-1}$) und eine Inflexion bei 1625 cm^{-1} , die auf das Vorliegen von $\text{Ar}-\text{C}=\text{C}-$ hinweisen könnte. Schliess-

Amidcarbonyl (1660 cm^{-1}) zugeordnet werden können. Beim Vergleich des Protonenresonanz-Spektrums mit demjenigen von I lässt sich ableiten, dass sämtliche C-CH₃-Gruppen und die N(CH₃)₂-Gruppe des Zizyphins im vorliegenden Bruchstück enthalten sind. Das Massen-Spektrum ergibt ein Molekulargewicht von 300 und zeigt wie beim Zizyphin¹⁾ ein markantes Fragment der Masse 114. Seine Bildung lässt sich nach BIEMANN *et al.* [9] erklären, wenn eine Fragmentierung an der durch Pfeil bezeichneten Stelle angenommen wird. Chemisch spaltet sich der Dipeptidester III durch kräftige saure Hydrolyse (CH₃COOH-HCl-H₂O) weiter auf und man erhält, wie bei I, das in der Einleitung schon erwähnte Isoleucin. Werden bei der Hydrolyse des Esters III etwas andere Bedingungen gewählt (6N HCl), so entsteht etwa zur Hälfte – offensichtlich unter Eliminierung der Dimethylaminogruppe⁶⁾ – eine ungesättigte Acyl-aminosäure, die als Natriumsalz unter Einwirkung von Pyridin und Acetanhydrid in ein Öl der Zusammensetzung C₁₂H₁₉O₂N übergeht. Diese Substanz bildet sich unter denselben hydrolytischen Bedingungen auch direkt aus Zizyphin. In ihrem Infrarot-Spektrum fällt vor allem die markante Carbonylfrequenz bei 1760 cm^{-1} und die etwas weniger intensive >C=N-Bande (1675 cm^{-1}) auf. Das Ultraviolett-Spektrum zeichnet sich durch ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 290 nm ($\epsilon = 14300$) sowie ein Minimum bei 240 nm aus. Einen weiteren wertvollen Hinweis liefert das Protonenresonanz-Spektrum, aus dem das Vorliegen von nur einem Vinylproton ($\delta = 4,58$) hervorgeht. Diese Eigenschaften lassen sich am besten mit der Azlacton-Struktur IV interpretieren.



Eine Bestätigung dieser Formel liefert die alkalische Hydrolyse, wobei das 3-Methylvaleriansäureamid entsteht, während bei der sauren Hydrolyse, nach vorangegangener Isomerisierung der zwei Doppelbindungen (vgl. Pfeile in IV), Isoleucin gebildet wird. In der Literatur werden Azlactone dieses Strukturtypes als sehr unbeständig beschrieben [10] ⁷⁾.

Das Azlacton IV, das schon am Anfang unserer Arbeiten als Produkt der sauren Hydrolyse gefasst worden war, erwies sich als sehr wertvoll zur Aufstellung der Strukturformel des später gefassten Dipeptidesters III. Der endgültige Strukturbeweis für III wurde durch die Synthese erbracht. Das nach INGRAM [11] hergestellte L-N,N-Dimethylisoleucin wurde nach BOISSONAS [12] mit L-Isoleucin-äthylester umgesetzt. Der dabei kristallin isolierte L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylester erwies sich in allen untersuchten physikalischen und chemischen Eigenschaften mit der durch Hydrolyse aus Zizyphin gewonnenen Substanz III identisch.

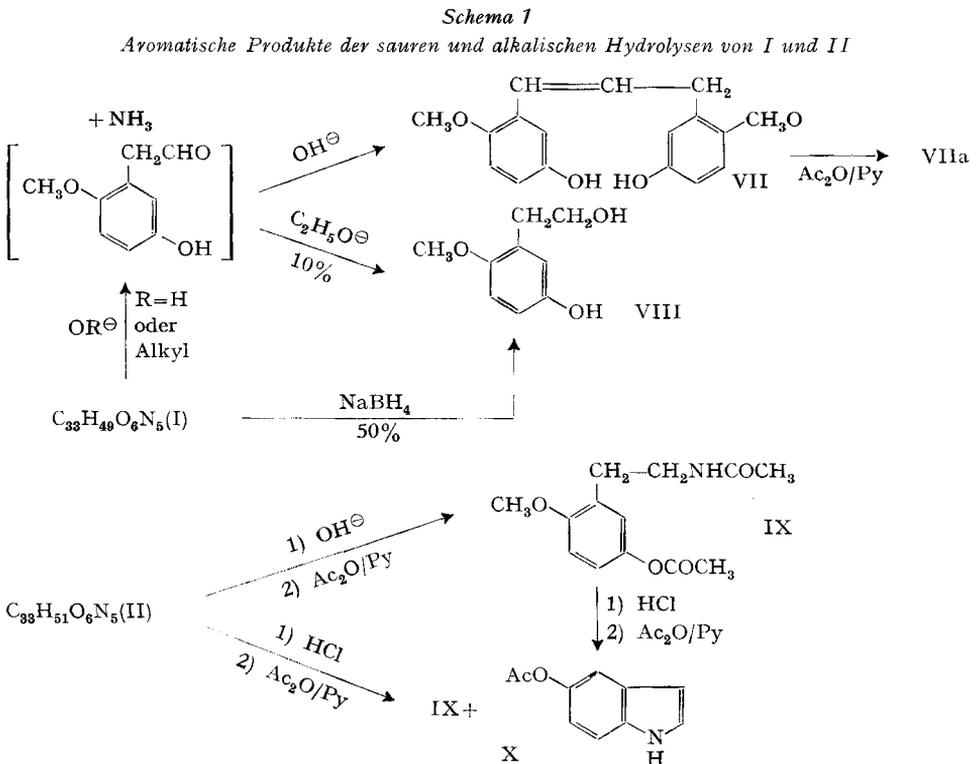
Die Substanzen IX und X, die aus sauren Hydrolysaten von Dihydrozizyphin (II) zusätzlich isoliert wurden, werden in Abschnitt II besprochen.

⁶⁾ Eine derartige Eliminierung einer Dimethylaminogruppe unter sauren Bedingungen ist unseres Wissens nicht beschrieben worden.

⁷⁾ Über weitere Befunde im Zusammenhang mit der komplizierten Chemie solcher Azlactone wird von dem einen von uns (E. Z.) später berichtet werden.

sierenden 2-Methyl-Derivat zur Kristallisation bringen lässt, und andererseits aus der weiter unten gesicherten Struktur des aromatischen Systems.

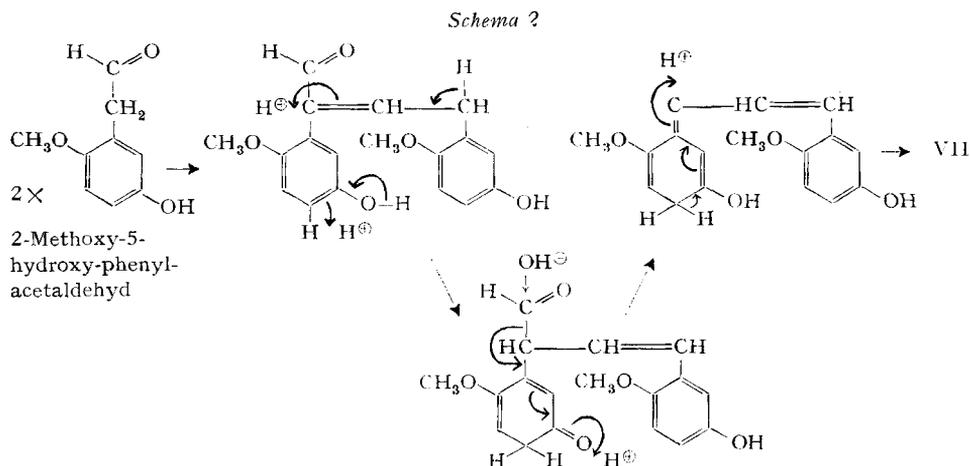
2) *Alkalische Hydrolyse von Zizyphin*. Wie Schema 1 zeigt, verläuft die alkalische Hydrolyse des Zizyphins unter Ammoniakabspaltung und Bildung einer kleinen Menge des stickstofffreien Produktes VII ⁹⁾. Sein Massen-Spektrum zeigt eine Molekelspitze von m/e 286. Das Ultraviolett-Spektrum besitzt zwei Maxima bei 255 nm ($\epsilon = 23300$) und 306 nm ($\epsilon = 9050$). Mit Pyridin/Acetanhydrid behandelt, bildet die Substanz ein Diacetat (VIIa) (Molekelspitze: m/e 370). Das Protonenresonanz-Spektrum dieses Derivates zeigt 2 Acetyl- und 2 Methoxygruppen, 6 aromatische Protonen, 2 Protonen entsprechend $-\text{CH}_2\text{Ar}$ und 2 Vinylprotonen entsprechend $-\text{CH}=\text{CH}-\text{Ar}$ an.



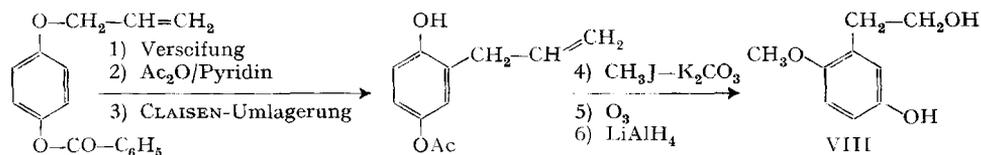
Die Entstehung der Substanz VII unter Ammoniakabspaltung lässt sich mit der von KENTARŌ ANZAI [13] beschriebenen alkalischen Hydrolyse von Tuberin vergleichen.

⁹⁾ Auch bei der schon besprochenen sauren Hydrolyse findet eine Abspaltung von Ammoniak statt, das als Ammoniumchlorid gefasst wurde. Für die Entstehung von NH_3 kann man nur 2 konstitutionelle Merkmale heranziehen, eine CONH_2 -Gruppe oder eine $-\text{C}=\text{C}-\text{NH}$ -Gruppierung in der Molekel. Die erstgenannte Möglichkeit wird schon sehr unwahrscheinlich aus dem Ergebnis der VAN SLYKE-Bestimmung ($0,5 \text{ NH}_2$)¹⁾ und wird schliesslich ganz ausgeschlossen dadurch, dass hydriertes I keine Spur von NH_3 bei der Hydrolyse freisetzt. Damit wurde das Vorliegen einer Enamingruppierung in I augenscheinlich gemacht.

In unserem Fall dürften der Kondensation des 2-Methoxy-5-hydroxyphenylacetaldehydes eine Isomerisierung der Doppelbindung und eine Abspaltung der Formylgruppe als Ameisensäure (vinyloge Retro-CLAISEN-Reaktion) folgen und somit VII als Endprodukt ergeben (Schema 2).



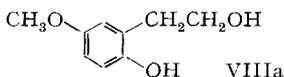
3) *Alkalische Hydrolyse des Zizyphins unter reduzierenden Bedingungen.* Erhitzt man Zizyphin in 1N wässrig-methanolischer Natronlauge in Gegenwart von Natriumborhydrid 16 Std. unter Rückfluss, so wird Ammoniak entwickelt und es lässt sich nach chromatographischer Reinigung des Reaktionsproduktes mit guter Ausbeute die kristallisierte Substanz $C_9H_{12}O_3$ (VIII, Schema 1) vom Schmelzpunkt 100° isolieren¹⁰⁾. Die gleiche Substanz bildet sich, allerdings in bedeutend schlechterer Ausbeute, beim Kochen von Zizyphin in Natriumäthylat-haltigem Äthanol. Auf Grund der für Substanz V abgeleiteten Struktur wurde diese bisher unbekannte Substanz als β -(2-Methoxy-5-hydroxy-phenyl)-äthylalkohol (VIII) angesprochen. Diese Struktur wurde durch die von 1-Allyloxy-4-benzoyloxy-benzol [14] ausgehende Synthese über folgende 6 Stufen sichergestellt¹¹⁾.



4) *Alkalische Hydrolyse von Dihydrozizyphin.* Wird Dihydrozizyphin (II) in starker wässrig-alkoholischer Natronlauge während 17 Std. hydrolysiert, so bildet sich

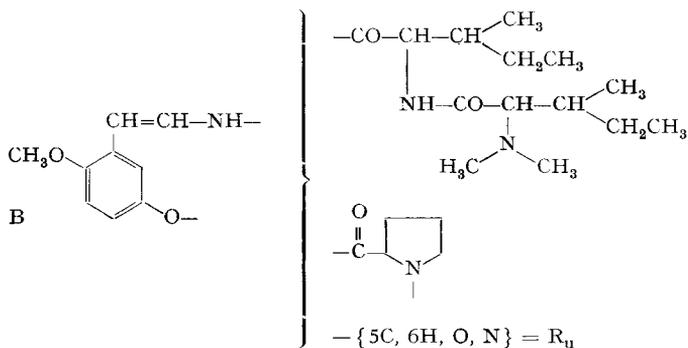
¹⁰⁾ Die ungewöhnlich leichte Spaltung der Ätherbindung unter den angegebenen Reaktionsbedingungen ist bemerkenswert.

¹¹⁾ Zur Kontrolle wurde auch noch der prinzipiell mögliche isomere Phenyläthylalkohol VIIIa (vgl. exp. Teil) hergestellt. Sein Smp. 88° ist jedoch von demjenigen von VIII deutlich verschieden. Das Gemisch der beiden zeigt eine starke Smp.-Depression.



kein Ammoniak und man kann nach Acetylierung und anschliessender Veresterung des Reaktionsproduktes (mit Äthanol/Salzsäure) neben dem Dipeptidester III und N-Acetylprolin-äthylester noch eine kristallisierte Substanz $C_{13}H_{17}O_4N$ (IX) (Schema 1) vom Smp. 84–86° abtrennen. Ihr Infrarot-Spektrum besitzt Banden für $>NH$ (3450 cm^{-1}), $Ar-OCOCH_3$ (1760 cm^{-1}) und $-NHCOCH_3$ (1660 cm^{-1}). Das Protonenresonanz-Spektrum weist Signale für CH_3O- ($\delta = 3,83$), CH_3COO- ($\delta = 1,93$), CH_3CONH- ($\delta = 2,26$), 3 aromatische Protonen ($\delta = 6,85$) und 4 Protonen für $-CH_2-CH_2-$ auf. Durch Einwirkung von starker Salzsäure bei Siedehitze im Einschmelzrohr und anschliessende Reacetylierung bildet sich das schon bekannte [15] 5-Acetoxyindol (X).

Die Strukturen der Hydrolysenprodukte VII, IX und X bestätigen die Anwesenheit einer Enamingruppe im Zizyphin⁹⁾. Aus dem Vergleich der Ultraviolett-Spektren von Zizyphin und Dihydrozizyphin (Fig. 1 und 2), wird abgeleitet, dass die einzige Doppelbindung in Konjugation mit dem aromatischen Kern steht. Die Art der Substitution dieses Kernes wird durch das Pyrolysenprodukt V und die auf synthetischem Wege bewiesene Struktur des Hydrolysenproduktes VIII festgelegt. Diese neuen Ergebnisse gestatten die Aufstellung der erweiterten Partialformel B.



III. Verknüpfungsart und -stelle des aromatischen Teils mit dem Dipeptidrest. *LiAlH₄-Reduktionsprodukt XI und dessen Perjodsäureabbau*

Aus der Partialformel B geht hervor, dass sich die drei nichtaromatischen Bruchstücke nur über zwei Verknüpfungsstellen mit dem chromophoren System verbinden lassen, einerseits über das Enamin-Stickstoffatom, andererseits über das phenolische Sauerstoffatom.

Die Infrarot-Spektren von I und II (breite Carbonylbande von 1670 bis 1703 cm^{-1}) zeigen, dass keine Esterbindung vorliegen kann. Damit wird eine direkte Verknüpfung des Prolin- oder des Dipeptidrestes mit dem phenolischen Sauerstoffatom ausgeschlossen. Einzig der im Formelbild B in Klammern gesetzte, noch unbekannte Molekelteil R_n kommt für die Besetzung dieser Bindung in Frage¹²⁾.

¹²⁾ Einzig eine Carbaminsäureester-Struktur, etwa des Typs $Ar-O-CO-N<$ liesse eine entsprechend herabgesetzte Carbonylfrequenz erwarten [16]. Aus dem Reaktionsgemisch von Zizyphin mit Phenylmagnesiumbromid konnten aber weder Benzoesäure noch Diphenylketon oder Triphenylcarbinol isoliert werden.

Es resultieren folgende zwei Möglichkeiten der Verknüpfung¹³⁾:

a) Dipeptidrest am Enamin-Stickstoff, Prolinrest über das Zwischenglied R_u am Sauerstoff. Dabei folgen sich am Phenyläthylenrest 3 Stickstoffatome, die ihrem Charakter nach: *sekundär-sekundär-tertiär* sind.

b) Der notwendigerweise endständige Dipeptidrest über ein Prolin-Zwischenglied am Enamin-Stickstoff, R_u allein am Sauerstoff. Stickstoffolge (4N) am Phenyläthylenrest: *sekundär - tertiiär - sekundär - tertiiär*.

Diese Frage lässt sich anhand des Lithiumaluminiumhydrid-Reduktionsproduktes XI von Dihydrozizyphin und seiner Umsetzung mit Perjodsäure entscheiden.

Die Reduktion von II mit $LiAlH_4$ verläuft sehr sauber und liefert eine einheitliche, im Hochvakuum destillierbare Base $C_{33}H_{59}O_2N_5$ (XI). Es bleibt also das gesamte Kohlenstoffgerüst des Zizyphins erhalten.

Aus dem Ultraviolett-Spektrum (Fig. 4) von XI geht hervor, dass hier das gleiche chromophore System wie in II vorliegt (vgl. Fig. 2, S. 405).

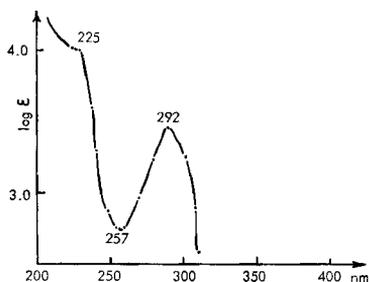


Fig. 4. UV-Absorptionsspektrum von XI (in C_2H_5OH)

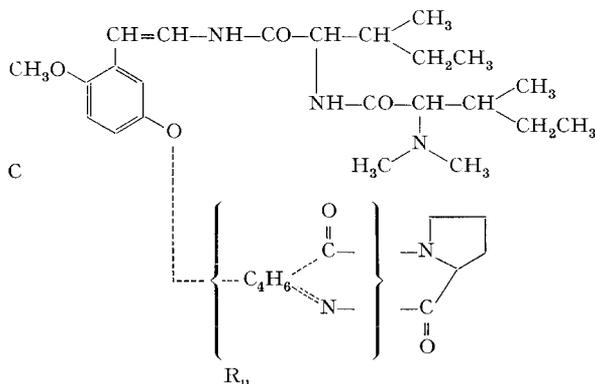
Da das Infrarot-Spektrum von XI keine Carbonylbande aufweist, müssen die vier hydrierbaren Sauerstoffe im Zizyphin amidischen Funktionen zugehören. Drei davon sind dem Dipeptidrest und dem Prolin-Rest zuzuordnen, während der vierte im Molekelteil R_u vorliegen muss.

Die zwei verbleibenden Sauerstoffatome sind, wie aus dem Abschnitt II hervorgeht, direkt am Phenylring angeschlossen, eines als Methoxygruppe, das andere notwendigerweise als Ätherbrücke zwischen dem aromatischen Kern und dem Molekelteil R_u . Mit Acetanhydrid/Pyridin lässt sich XI in die Diacetylverbindung XIa überführen, womit auf die Anwesenheit von zwei sekundären und 3 tertiären Aminogruppen in XI geschlossen werden kann.

Da α -Diamine mit einem tertiären Stickstoffatom durch Perjodsäure nicht gespalten werden, ist nur bei Variante a) der Verknüpfung (siehe oben) ein Abbau zu erwarten. Dieser findet tatsächlich statt und die beiden zu erwartenden Aldehyde (Formaldehyd und optisch aktives 2-Methylbutanal) können in Form ihrer Dinitrophenylhydrazone isoliert und charakterisiert werden. Damit ist die Variante a) eindeutig bewiesen. Das erhaltene 2-Methylbutanal-dinitrophenylhydrazon besitzt den Smp. $129-131^\circ$ und $[\alpha]_D = +25,5^\circ$. Die Werte für das Dinitrophenylhydrazon des gleichen

¹³⁾ Eine formal denkbare dritte Variante (Prolinrest am Enamin-Stickstoff, Dipeptidrest über R_u am Sauerstoff) muss von vorneherein ausgeschlossen werden, da sie für das Zizyphin zwei basische Zentren bedingen würde.

Aldehyds, der aus reinem L-Isoleucin durch Oxydation mit Ninhydrin nach LÖHR [17] erhalten worden ist, lauten $129-130^\circ$ und $+23^\circ$. Andererseits haben BROCKMANN *et al.* [18] für das entsprechende Abbauprodukt aus D-Isoleucin die Werte von 130° und $-21,2^\circ$ erhalten. Ebenso verhielten sich beide Proben bei der Dünnschichtchromatographie [19] und der Massenspektroskopie gleich. Für das Zizyphin ergibt sich demnach folgende erweiterte Partialformel C, wobei die Umschreibung des Restes R_u aus dem bewiesenen tertiären Charakter der restlichen zwei Amidgruppen hervorgeht:



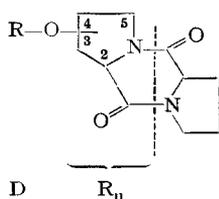
IV. Strukturermittlung der restlichen Molekelbestandteile und ihre Verknüpfung mit dem aromatischen Teil. Ozonabbau und Nachweis von 4-Hydroxyprolin

Bei der Ermittlung der Struktur des in der Partialformel C eingeklammerten Bruchstückes R_u müssen zunächst folgende Punkte berücksichtigt werden:

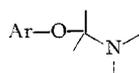
- R_u kann keine C-Methylgruppen enthalten, da die vier C-Methylgruppen, die aus dem Protonenresonanz-Spektrum (Fig. 7) von Zizyphin hervorgehen, schon im Dipeptidrest lokalisiert sind (vgl. S. 406).
- R_u kann keine Doppelbindung besitzen, da die einzige hydrierbare Doppelbindung in der Styrolamingruppierung vorliegt¹⁴⁾.
- Entsprechend dem Verhältnis der Anzahl der Kohlenstoffatome zur Anzahl der Wasserstoffatome muss R_u an der Bildung zweier Ringe beteiligt sein.
- Aus dem Infrarot-Spektrum von XI (vgl. S. 412) geht hervor, dass der Prolinrest und R_u zusammen zwei amidische Funktionen besitzen. Dies lässt sich nur durch wechselseitige Absättigung der sauren und basischen Funktionen unter Amidbrückenbildung erklären.
- R_u muss mit dem aromatischen Ring ätherartig verbunden sein. Im Protonenresonanz-Spektrum von XI ist ein Ätherbrückenwasserstoff ($\delta = 4,66$) gut sichtbar.
- Aus den Produkten der trockenen Destillation von Zizyphin liess sich Pyrocoll (VI) isolieren (s. Seite 408).
- Die Struktur von R_u muss eine plausible Erklärung für die bei der sauren Hydrolyse von Zizyphin und Dihydrozizyphin (S. 408) beobachtete Kohlendioxid-Entwicklung geben können.

¹⁴⁾ Aus dem Angebot von vier Kohlenstoffatomen lässt sich keine Struktur mit einer nicht-hydrierbaren, tetrasubstituierten Doppelbindung aufstellen.

Alle diese Punkte lassen sich mit der Teilstruktur D in Einklang bringen:



Das Zwischenglied R_u wäre somit auf einen Hydroxyprolin-Rest zurückzuführen, dessen Hydroxyl-Sauerstoff die Ätherbrücke zum aromatischen Teil des Zizyphins bildet. Für den Ort dieser Sauerstoff-Verknüpfung kommen nur die Kohlenstoffatome in Frage, welche in β -Stellung zum Stickstoff stehen (Stellung 3 und 4). Bei einer Verknüpfung mit den α -ständigen Kohlenstoffatomen lägen Carbinol-amino-

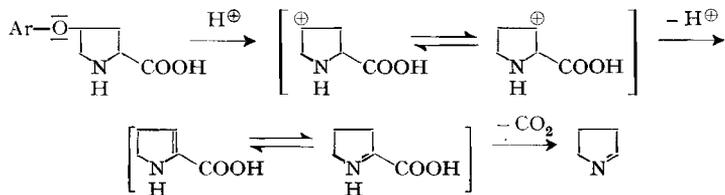


äther-Strukturen vor, die schon mit Phenylmagnesiumbromid hätten gespalten werden sollen¹⁰⁾, sicherlich aber dem LiAlH₄-Reagenz nicht standgehalten hätten [20].

Im Zusammenhang mit dem Punkt g) sei an dieser Stelle vermerkt, dass bei der quantitativen Prolinbestimmung [21] nur 1 Mol. Prolin gefunden wird. Die Annahme, dass der Chromophor über eine Ätherbrücke mit dem Kohlenstoffatom 4 des Heterorings verbunden ist, macht verständlich, dass sich die dabei direkt beteiligte Aminosäure bis zum Ende der Konstitutionsermittlung dem Nachweis unter klassischen Hydrolysenbedingungen entzogen hat.

In der Literatur sind ausser dem L-Hydroxyprolinmethyläther keine Hydroxyprolinäther beschrieben worden und somit ist das Verhalten solcher Äther bei der Hydrolyse nicht bekannt. L-Hydroxyprolin erfährt bei 20stündigem Kochen in 6N Salzsäure keine Zersetzung [22]. Eine Spaltung der Ätherbindung kann beim Zizyphin nur zwischen dem Kohlenstoffatom 4 und dem Sauerstoffatom erfolgen, nicht aber zwischen dem Arylkohlenstoffatom und dem Sauerstoffatom. Deshalb ist zu erwarten, dass bei unseren Versuchsbedingungen nicht L-Hydroxyprolin als erstes Hydrolysenprodukt auftritt, sondern wahrscheinlich Δ^3 -Pyrrolincarbonsäure. Diese Säure wird nach ROBERTSON & WITKOP [23] durch 2stündiges Kochen in 5N Salzsäure noch nicht isomerisiert, dürfte aber unter unseren Versuchsbedingungen (16-stündiges Kochen in konz. Salzsäure¹⁵⁾) zur Δ^2 -Pyrrolincarbonsäure isomerisiert

¹⁵⁾ Ist die Δ^3 -Pyrrolincarbonsäure auch bei diesen Bedingungen nicht isomerisierbar, so müsste die Reaktionsfolge, durch Annahme einer Hydridwanderung, wie folgt formuliert werden:



werden, die ihrerseits in Gegenwart von Säure instabil ist [24] und sich zur Δ^1 -Pyrrolinecarbonsäure umlagert. Als SCHIFF'sche Base einer α -Ketocarbonsäure decarboxyliert sich die letztere ausserordentlich leicht zu Δ^1 -Pyrrolin [25]¹⁶⁾.

Es gelang schliesslich, das erwähnte Δ^1 -Pyrrolin auch eindeutig unter den Hydrolysenprodukten von Dihydrozizyphin nachzuweisen. Dazu wurde zunächst das Verhalten von authentischem Δ^1 -Pyrrolin in kochender 30-proz. Schwefelsäure, d. h. unter den Hydrolysenbedingungen für Dihydrozizyphin, untersucht. Im Modellversuch konnte festgestellt werden, dass, ausser einer Ringöffnung, keine wesentliche Veränderung des Molekelgerüsts erfolgt. Die Annahme der Ringöffnung folgt aus der positiven Farbreaktion des Δ^1 -Pyrrolinhydrochlorids mit Ninhydrin. Sowohl das Produkt, das bei der Behandlung von authentischem Pyrrolin [27] mit verdünnter Salzsäure entsteht, wie auch das nach der Schwefelsäurebehandlung als Hydrochlorid isolierte Abbauprodukt von Dihydrozizyphin verhalten sich im Dünnschichtchromatogramm vollkommen gleichartig.

Weiterhin konnte nach der Hydrolyse des Dihydrozizyphins mit gleich konzentrierter Schwefelsäure aus der alkalisierten Reaktionslösung eine picolinähnlich riechende Base mit Wasserdampf übergetrieben werden. Nach Ansäuern des Destillats mit verdünnter Salzsäure, Eindampfen und Wiederaufnehmen in Wasser verhielt sich eine Probe davon im Dünnschichtchromatogramm gegenüber Ninhydrin gleich wie das aus Δ^1 -Pyrrolin hergestellte Hydrochlorid. Ausserdem gaben beide Proben mit *o*-Aminobenzaldehyd die gleiche intensive Gelbfärbung, eine Reaktion, die von SCHÖPF aufgefunden und als sehr charakteristisch für cycl. SCHIFF'sche Basen formuliert wurde [28].

Schliesslich verblieb noch die Aufgabe, das Dihydrozizyphin derart abzubauen, dass 4-Hydroxyprolin als Reaktionsprodukt entstand. Bei der Ozonolyse von II wird der aromatische Kern zerstört und bei der anschliessenden Hydrolyse ist eine Spaltung zwischen dem Äthersauerstoff und dem daran gebundenen, ursprünglich dem Aromaten zugehörigen Kohlenstoffatom zu erwarten. In einem derartigen Hydrolysat konnte nun tatsächlich 4-Hydroxyprolin mit Ninhydrin und Isatin als Indikatoren eindeutig nachgewiesen werden. Prinzipiell bestand noch die Möglichkeit einer Ätherbindung zum Kohlenstoff in 3-Stellung; dies wäre gleichbedeutend mit dem Vorliegen eines 3-Hydroxyprolinbausteins im Naturstoff¹⁷⁾. Erst in jüngster Zeit fanden SHEEHAN und OGLE mit ihren Mitarbeitern, unabhängig voneinander diese neue Aminosäure auf [29]. Sowohl das 3-Allo-DL-Hydroxyprolin, wie auch das 3-DL-Hydroxyprolin, von welchen uns Prof. SHEEHAN in liebenswürdiger Weise Proben zum Vergleich zur Verfügung stellte, zeigten vor allem mit Isatin keine Himmelblaufärbung wie das 4-Hydroxyprolin, sondern – und zwar erst bei stärkerem und längerem Erhitzen – eine leichte Blaupurpurfärbung¹⁸⁾. Eine Probe von L-Prolinanhydrid lieferte unter analogen Reaktionsbedingungen keine Spur von Hydroxyprolin, womit auch der Nachweis erbracht ist, dass das im Zizyphin gefundene 4-Hydroxyprolin

¹⁶⁾ Der Decarboxylierungsmechanismus wurde von ASHWORTH *et al.* [26] formuliert.

¹⁷⁾ Für ein derartiges Strukturelement (β -Carbonyläther-Gruppierung) wäre die beobachtete Ätherspaltung im alkalischen Medium (S. 409) vorauszusehen gewesen.

¹⁸⁾ Mit Ninhydrin geben sowohl 4-Hydroxyprolin wie auch 3-Hydroxyprolin die gleiche Gelbfärbung.

kein Artefakt darstellt. Somit wäre die für das Zizyphin auf Seite 405 angegebene Konstitution (Formel I) bewiesen¹⁹⁾.

Anschliessend noch einige Bemerkungen zur Stereochemie des Zizyphins. Das präparativ isolierte Prolin⁸⁾ ist linksdrehend und somit der L-Reihe zuzuordnen. Ebenso handelt es sich beim Isoleucin (vgl. S. 408) und auch beim N,N-Dimethylisoleucin um L-Aminosäuren. Die Konfiguration letzterer Aminosäure folgt aus der Vergleichssynthese von III (s. Seite 421). Die Konfiguration am α -C-Atom des Hydroxyprolinelementes ist mit grösster Wahrscheinlichkeit der L-Reihe zuzuordnen, da nur so der Drehwert des Dihydrozizyphins ($[\alpha]_D = -188^\circ$, $c = 1$)¹⁾ verständlich wird (vgl. dazu den Drehwert von L-Prolinhydrat: $[\alpha]_D = -147^\circ$ [36]). Hingegen bleibt die Konfiguration am Kohlenstoffatom 4 des Hydroxyprolinelementes (Partialformel D) ohne experimentelle Zuordnung.

Die Abklärung der Geometrie der Doppelbindung des Zizyphins wird im nächsten Abschnitt besprochen.

V. Überprüfung der Struktur des Zizyphins mittels A) Massen- und B) Protonenresonanz-Spektren. Konfiguration der Styryldoppelbindung

A) Massen-Spektrum²⁰⁾ (Fig. 5 und 6). Die Massen-Spektren stehen nicht in Widerspruch zur chemisch abgeleiteten Struktur. Beim Dihydrozizyphin sind von m/e 386 aufwärts Fragmente 2ME schwerer als die entsprechenden Fragmente des Zizyphins.

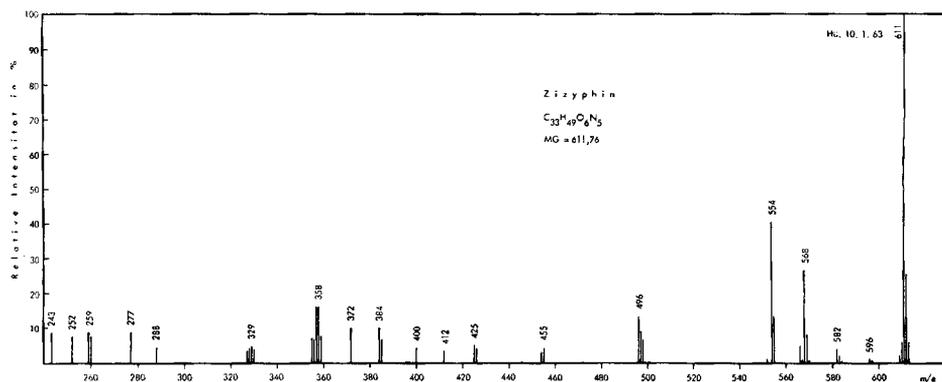


Fig. 5. Massen-Spektrum von Zizyphin

- ¹⁹⁾ Zizyphin ist der erste aus höheren Pflanzen isolierte Naturstoff, der eine Dioxopiperazin-Teilstruktur aufweist. Unter den Pilzstoffwechselprodukten ist die Teilstruktur hingegen schon bekannt und kommt z. B. beim Echinulin [30] und beim L-Phenylalaninhydrat [31] vor. Sie muss auch für die biogenetischen Vorläufer der Piperazinderivate Aspergillusäure [32], Gliotoxin [33], Flavocol [34] und Pulcherrimisäure [35] angenommen werden.
- ²⁰⁾ Die Massen-Spektren von Zizyphin und Dihydrozizyphin wurden mit einem Massenspektrometer ATLAS Modell CH4 aufgenommen, unter Verwendung der Ofenionenquelle TO_4 (mit der normalen Wolfram-Band-Kathode) und SEV-Auffänger. Der Thermostat war auf 50° eingestellt, die Temperatur der Ionenquelle betrug $150-200^\circ$. Der Tiegelheizstrom betrug ca. 0,2 Amp., die Elektronenenergie 70 eV, der Elektronenstrom $35 \mu\text{Amp}$. Die Ionenbeschleunigungsspannung war auf 1,86 kV herabgesetzt.

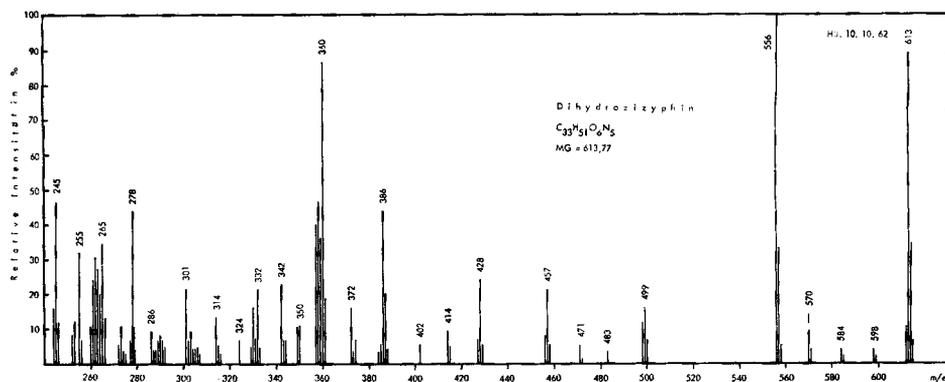
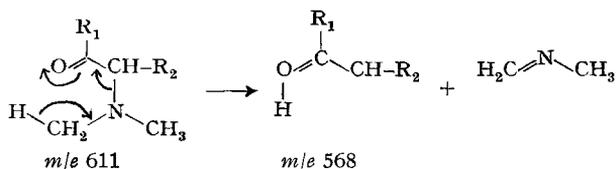
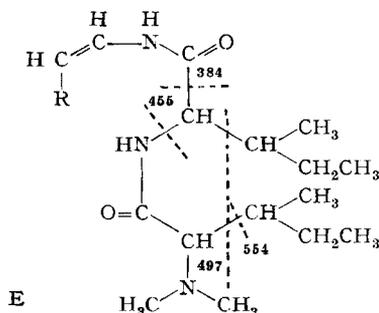


Fig. 6. Massen-Spektrum von Dihydrozizyphin

Das Fragment m/e 568 entsteht aus dem Molekelion durch Abspaltung von 43ME, was durch die metastabile Spitze bei m/e 529 belegt wird. Der dazu gehörende Spaltungsmechanismus kann wie folgt formuliert werden:



Die wichtigsten schwereren Fragmente lassen sich durch einen stufenweisen Abbau der peptidischen Seitenkette erklären (Partialformel E; für Fragment 384, vgl. ²¹⁾).



Das Fragment 554 erscheint noch als doppelgeladenes Ion bei m/e 277. Es lässt sich keine Fragmentierung direkt mit der Dioxopiperazin-teilstruktur in Zusammenhang bringen.

Das Massen-Spektrum von Zizyphinhydrochlorid ist weitgehend identisch mit demjenigen des Zizyphins.

Das Massen-Spektrum des (N,N-Dimethylisoleucyl)-isoleucin-äthylesters (III) (das bei einer Ionenquellentemperatur von 70° aufgenommen wurde), weist anstelle

²¹⁾ Unter Umlagerung eines Protons.

des Fragmentes *M*-43 das der Abspaltung von Dimethylamin entsprechende Fragment *M*-45 auf.

B) *Protonenresonanz-Spektren*²²⁾. Die Figur 7 zeigt das Protonenresonanz-Spektrum von Zizyphin, das in Deuteriochloroform aufgenommen wurde. In der Region $\delta = 0-4$ lassen sich die 12 C-CH₃- ($\delta = 0,78-1,1$), die 6 N-CH₃- ($\delta = 2,28$) und die 3 O-CH₃- ($\delta = 3,78$) Wasserstoffatom-Signale identifizieren. Der Untergrund in diesem Bereich stammt von den Signalen der restlichen 16 Wasserstoffatome.

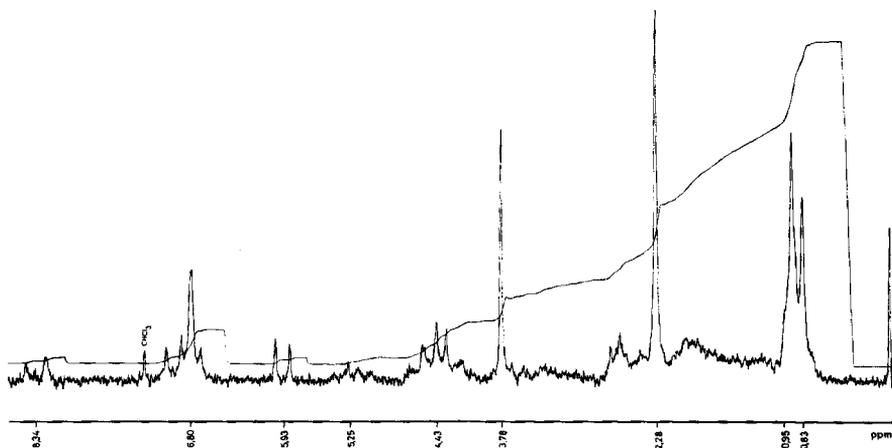


Fig. 7. Protonenresonanz-Spektrum von Zizyphin (I) (in CDCl₃)

Die Signale zwischen $\delta = 4,0$ und $\delta = 4,8$ entsprechen 5 Protonen und werden den α -Wasserstoffatomen der 4 Aminosäurereste [8] und dem freien $>NH$ der Isoleucylseitenkette zugeschrieben. Das Multiplett bei $\delta = 5,25$ wird dem Ätherbrückenwasserstoff des Dioxopiperazins zugeordnet. Eine gleich grosse chemische Verschiebung wurde beim Ätherproton des Pandamins [3] gefunden, welches durch eine α -ständige, allerdings frei drehbare Amidgruppe ausgezeichnet ist. Im Spektrum des LiAlH₄-Reduktionsprodukts XI findet sich bei $\delta = 4,66$ ein Signal, das dem selben Ätherwasserstoffatom zugeschrieben wird. Beim Diacetylprodukt XIa erscheint das Signal bei $\delta = 4,24$.

Die Integration der Signale bei schwacher Magnetfeldstärke ($\delta = 5,5-8,5$) entspricht sechs Protonen. Diese werden der Styrylgruppe wie folgt zugeordnet:

a) Das Dublett bei $\delta = 5,93$ ($J = |8,5|$ Hz) wird dem zum Phenylkern α -ständigen Doppelbindungsproton zugeschrieben. Ein Doppelresonanzversuch zeigt, dass es in den Signalkomplex mit Schwerpunkt bei $\delta = 6,80$ hineinkoppelt.

b) Das verbreiterte Dublett bei $\delta = 8,34$ ($J \approx |11|$ Hz) dürfte von einem aromatischen Wasserstoffatom stammen, das mit einem *o*-Wasserstoffatom koppelt. Es tritt bei überraschend tiefer Magnetfeldstärke auf. Mittels Doppelresonanz wurde eine Kopplung zum schon erwähnten Signalkomplex bei $\delta = 6,80$ nachgewiesen.

²²⁾ Die Protonenresonanz-Spektren wurden mit einem VARIAN A-60-Spektrometer in Deuteriochloroform aufgenommen. Die Protonenresonanz-Signale sind in δ -Werten [37] angegeben und auf Tetramethylsilan als internen Standard bezogen.

c) Der Gruppe von Signalen zwischen $\delta = 6,60$ und $7,18$, deren Integration vier Wasserstoffatomen entspricht, werden das β -Vinylwasserstoffatom, die zwei übrigen aromatischen Wasserstoffatome und das Enamidwasserstoffatom zugeordnet.

Im Protonenresonanzspektrum des Dihydrozizyphins sind die Dublette bei $\delta = 5,93$ und $\delta = 8,34$ nicht mehr sichtbar. Der Schwerpunkt der Signale der drei aromatischen Protonen liegt bei $\delta = 6,75$, während das Ätherproton die gleiche chemische Verschiebung und eine ähnliche Feinstruktur aufweist.

Die Kopplungskonstante von $|8,5|$ Hz des sichtbaren Vinylprotons ($\delta = 5,93$, Fig. 7) deutet auf *cis*-Substitution der Doppelbindung [38] hin.

An dieser Stelle sei es dem einen von uns (E. Z.) gestattet, Herrn Prof. O. JEGER (ETH, Zürich) für sein grosses Interesse an dieser Arbeit zu danken. Ferner dankt E. Z. dem Präsidenten des Schweiz. Schulrates für die Erteilung eines Syntex-Stipendiums, das ihm den Gastaufenthalt an der ETH, Zürich ermöglichte. Weiter gilt unser Dank den Herren Dr. J. SEIBL (ETH, Zürich) und Dr. H. HÜRZELER (CIBA, Basel) für die Aufnahme und ausführliche Interpretation der Massen-Spektren sowie den Herren P.-D. Dr. W. SIMON (ETH, Zürich) und Dr. R. ZÜRCHER (CIBA, Basel) für die Aufnahme und Auswertung der NMR.-Spektren. Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der ETH (Leitung: W. MANSER) ausgeführt und werden bestens verdankt.

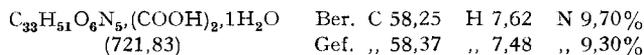
Experimenteller Teil

A. Hydrierungs- und Acetylierungsversuche mit Zizyphin (I)¹⁾

1. *Katalytische Hydrierungen zu Dihydrozizyphin (II)*. - a) 1,21 g amorphe Base I wurden in alkoholischer Lösung über 380 mg Pd-C(10-proz.) hydriert. Nach 15 Min. war die Wasserstoffaufnahme beendet (ber. für 1 H₂ 46 ml; gef. 46 ml). Das Dihydrozizyphin verhält sich im Dünnschichtchromatogramm (SiO₂) einheitlich. Es lässt sich nicht wie Zizyphin und Zizyphinin mittels Besprühen mit 50-proz. H₂SO₄ sichtbar machen; man verwendet hier zweckmässig das Kaliumjodplatinat-Reagenz (modif. DRAGENDORFF).

Systeme	Chloroform-Aceton-(95:5)	Chloroform-Aceton-(7:3)	Benzol-Aceton (1:1)	Dioxan-Wasser (9:1)
Rf-Werte	0,0	0,25	0,48	0,70

b) Das kristallisierte Oxalat des Zizyphins (I) (Smp. 141°) nahm in alkoholischer Lösung über Pd-C(10-proz.) genau die für 1 Mol. berechnete Menge Wasserstoff auf. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Verjagen des Lösungsmittels i. V. wurde der zähflüssige Rückstand aus Methylenchlorid-Äther umkristallisiert. Smp. 130-132°.



c) Mit Pd-Mohr als Katalysator in C₂H₅OH als Lösungsmittel erfolgte ebenso Aufnahme von 1 Mol. H₂.

d) 245 mg freie Base I nahmen in Eisessig über aushydriertem PtO₂ 9,5 ml (ber. für 1 H₂ 9,2 ml) auf. Die Hydrierung war nach einer Stunde beendet.

2. *Acetylierungsversuch*. 26 mg amorphes Zizyphin (I) wurden mit 0,5 ml Acetanhydrid und zwei Tropfen Pyridin versetzt. Nach kurzem Erwärmen auf 30° und zweitägigem Stehen dampfte man das Reaktionsgemisch i. V. ein und versetzte den Rückstand mit ätherischer Oxalsäurelösung. Die Fällung wusch man mehrmals mit Äther und kristallisierte aus Methylenchlorid-Äther um: Smp. 139-141°; Misch-Smp. mit Zizyphinoxalat ohne Depression.

B. Umwandlungen und Abbaureaktionen zur Konstitutionsermittlung des Zizyphins

I. Hydrolysen mit Mineralsäure und Strukturaufklärung des dabei gebildeten kristallisierten Dipeptidesters (III). Isolierung von L-Prolin, L-Isoleucin und 5-Acetoxyindol (X).

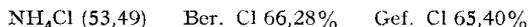
1. *Papierchromatographischer Nachweis von Prolin und Isoleucin.* 200 mg Zizyphin wurden in 4 ml Eisessig gelöst, mit 12 ml 10N Salzsäure und 4 ml Wasser versetzt und im Stickstoffstrom 24 Std. unter Rückfluss gekocht. Eine Probe von 0,5 ml wurde bei 12 Torr eingedampft, und der Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol aufgenommen. 0,04 ml dieser Lösung (400 µg) wurden absteigend auf Papier chromatographiert, wobei Isoleucin und Prolin eindeutig identifiziert werden konnten (siehe Tabelle).

Papierchromatographischer Nachweis von Prolin und Isoleucin

Systeme	Papier	Gemessene Rf-Werte	
		Prolin	Isoleucin
<i>n</i> -Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (100:100:20:50)	WHATMAN 1	0,3	0,52
<i>i</i> -Propanol-Ameisensäure-Wasser (40:2 g:10)	WHATMAN 1	0,42	0,65
<i>t</i> -Amylalkohol- <i>i</i> -Propanol-Triäthylamin- ²³⁾ Veronal-Wasser (100:40:0,8:1,8 g:50)	WHATMAN 3	0,46	0,77

2. *Isolierung des L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylesters (III).* 450 mg Zizyphin wurden 14 Std. in 20 ml 6N Salzsäure unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung färbte sich dunkelviolett. Nach Eindampfen und Untersuchung einer Probe auf Aminosäuren konnte im Dünnschichtchromatogramm nur Prolin festgestellt werden.

Anschließend alkalisierte man mit 1N KOH und trieb das gebildete Ammoniak in eine mit 1N Salzsäure gefüllte Vorlage. Das nach dem Trocknen erhaltene Salz (35 mg) sublimierte man bei 0,05 Torr und 130–140° und erhielt 30 mg NH₄Cl.



Der alkalisch wässrige Rückstand wurde darauf mit 1N Salzsäure angesäuert und mehrmals i. V. zur Trockne eingedampft. Die letzten Reste Wasser wurden durch zweimaliges Aufnehmen in abs. Alkohol und Abdestillieren desselben entfernt. Nach neuerlichem Aufnehmen in 50 ml abs. Alkohol und Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff bis zur Sättigung filtrierte man von unlöslichem NaCl ab, dampfte das Filtrat i. V. ein, nahm den Rückstand in CH₂Cl₂ auf und versetzte die so erhaltene Suspension mit 100 ml einer mit NH₃ gesättigten Methylenchloridlösung. Dabei trat deutlich Aufhellung ein. Der nach dem Verjagen des Lösungsmittels resultierende Rückstand wurde in Äther aufgenommen; die gelbe Lösung wurde von unlöslichen Teilen abfiltriert und eingedampft. Der ölige Rückstand wurde i. V. destilliert (120–125°). Das zunächst ölig übergegangene Produkt kristallisierte alsbald zur Gänze (Ausbeute 45 mg, Smp. 43–53°) und war sehr gut in allen organischen Lösungsmitteln und gut in Wasser löslich.

Aus einem zweiten grösseren Ansatz (1,5 g) gewann man 0,36 g desselben Rohproduktes.

Chromatographie an 15 g Al₂O₃ («WOELM», neutral, Akt.-Stufe II) (Säule: *h* = 10 cm, *d* = 1,2 cm):

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht
1	Benzol-Petroläther (1:1)	20 ml	—
2	Benzol-Petroläther (1:1)	30 ml	0,125 g
3	Benzol-Petroläther (1:1)	30 ml	0,025 g
4	Benzol-Petroläther (1:1)	40 ml	0,023 g
5	Benzol-Petroläther (1:1)	30 ml	0,010 g

²³⁾ Dieses System gestattet eine einwandfreie Auftrennung von Leucin und Isoleucin [39].

Der so gewonnene L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylester (III) kristallisierte vollkommen ohne ölige Anteile. Smp. 56–57°; $[\alpha]_D = -4^\circ$ (in CHCl_3 , $c = 0,312$). Massen-Spektrum: $\text{MG} = 300$, charakteristisches Hauptfragment m/e 114. IR.-Spektrum: $-\text{COOC}_2\text{H}_5$: 1725 cm^{-1} ; $-\text{NHCO}-$: 1660 cm^{-1} ; $>\text{NH}$: 3350 cm^{-1} . NMR.-Spektrum: markanteste Bande: $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 2,3 δ . $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{N}_2$ (300,43) Ber. C 63,96 H 10,74 N 9,33% Gef. C 63,99 H 10,81 N 9,52%

3. *Synthese des L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylesters (III)*. – a) Die Darstellung von L-N,N-Dimethylisoleucin erfolgte in Analogie zu dem Verfahren nach INGRAM [11]. Für 1 g L-Isoleucin verwendete man 0,5 g Pd-C(10-proz.) und 3 ml 40-proz. Formalinlösung. Die berechnete Menge H_2 war erst nach 36 Std. aufgenommen. Nach Umkristallisieren aus Aceton (Ausbeute 0,1 g) Smp. 173–174°; $[\alpha]_D^{20} = +48^\circ$ (in H_2O , $c = 1$).

$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$ (159,22) Ber. C 60,34 H 10,76 N 8,80% Gef. C 60,45 H 10,67 N 8,64%

b) 50 mg L-N,N-Dimethylisoleucin wurden in Anlehnung an das Verfahren von BOISSONAS [12] in 8 ml eines Methylenchlorid-Chloroform-(1:1)-Gemisches gelöst. Dazu fügte man 0,15 ml frisch über KOH abdestilliertes Triäthylamin und 0,1 ml Chlorameisensäure-äthylester und liess 10 Min. stehen. Dann versetzte man mit 50 mg L-Isoleucin-äthylester, gelöst in 2 ml Chloroform, und liess 10 Min. stehen (keine sichtbare CO_2 -Entwicklung, da offenbar alles Gas gelöst blieb). Nach kurzem Erhitzen unter Rückfluss (5 Min.) wurde mit 15 ml 10-proz. HCl ausgeschüttelt. Die salzsaure Phase wurde noch zweimal mit Äther ausgeschüttelt (organische Phase verworfen). Nach Alkalisieren der salzsauren Lösung mit K_2CO_3 (Trübung) und Ausschütteln mit Äther (3mal mit je 10 ml) trocknete man noch kurz über K_2CO_3 . Der nach dem Verjagen des Äthers resultierende Rückstand ging bei der Destillation im Kugelrohr bei einer Badtemperatur von 110–120° (0,001 Torr) als farbloses, viskoses Öl über, das beim Beimpfen mit einem Kristall von III sofort fast zur Gänze kristallisierte. Nach Einziehenlassen anhaftender öligere Anteile auf Ton resultierten 13 mg (13,8% d. Th.) schneeweisse Kristalle des L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylesters (III); Smp. 56–57°, Misch-Smp. mit III ohne Depression. $[\alpha]_D = -5^\circ$ (in CHCl_3 , $c = 0,36$).

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{N}_2$ (300,43) Ber. N 9,33% Gef. N 9,25%

Die Massen-Spektren des synthetischen und des aus Zizyphin isolierten Dipeptid-äthylesters sind identisch.

4. *Saure Hydrolyse des L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylesters (III)*. 25 mg III wurden mit 2 ml einer Mischung von Eisessig-Wasser-konz. Salzsäure (4:4:12) im geschlossenen Rohr nach Spülung mit N_2 20 Std. auf 140° gehalten. Dann wurde abgedampft. Der Rückstand lieferte im Dünnschichtchromatogramm einen Fleck, der einem Leucin zuzuordnen ist. Dass es sich um Isoleucin handelt, folgt einwandfrei aus der genaueren papierchromatographischen Untersuchung.

Verwendet wurde WHATMAN-Papier Nr. 3. Entwickelt wurde absteigend mit *t*-Amylalkohol-Isopropanol-Triäthylamin-Wasser (100:40:0,8:50) unter Zusatz von 1,8 g Veronal [39].

5. *Präparative Isolierung von L-Prolin (als Reinechat) und L-Isoleucin aus Zizyphin*. 0,6 g Zizyphin (I) erhitzte man unter N_2 -Spülung 40 Std. mit 40 ml 30-proz. Schwefelsäure unter Rückfluss. Dabei entwich eine beträchtliche Menge CO_2 , das durch Einleiten des Spülgases in $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung nachgewiesen wurde. Den gebildeten, zum Teil schon ausgeschiedenen violetten Farbstoff filtrierte man ab und neutralisierte mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bis $\text{pH} = 6,5$ (approximativer isoelektrischer Punkt von Monoaminosäuren). Die nach Abzentrifugieren des BaSO_4 resultierende Lösung dampfte man i. V. zur Trockne ein. Den verbleibenden, braun gefärbten harzigen Rückstand nahm man mit 100 ml abs. Alkohol auf und dampfte nochmals ein. Bei neuerlichem Zusatz von 20 ml abs. Alkohol verblieb ein feinkristalliner unlöslicher Rückstand, der sich gut abzentrifugieren liess. Nach einmaligem Digerieren mit 2 ml abs. Alkohol und neuerlicher Abtrennung durch Zentrifugieren sublimierte man das getrocknete Produkt bei 150–160°/0,001 Torr. Nach Umkristallisieren aus 96-proz. Alkohol und abermaliger Sublimation resultierten 26 mg L-Isoleucin, Smp. 274–284° (Zers.). $[\alpha]_D = +10,5^\circ$ (in H_2O , $c = 1,9$); Lit.: $[\alpha]_D = +11,3^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ (131,17) Ber. N 10,68% Gef. N 11,00%

Die vom Isoleucin befreite alkoholische Phase versetzte man zur Ausfällung des Prolins mit CdCl_2 . Nach mehrmaligem Waschen des CdCl_2 -Prolinkomplexes mit abs. Alkohol wurde wieder in Wasser gelöst, auf 60° erwärmt und H_2S eingeleitet. Nach Abtrennung des CdS hinterblieb

beim Eindampfen der wässrigen Phase eine klebrige, HCl enthaltende Masse. Diese wurde mit 1 ml 30-proz. Schwefelsäure versetzt und i. V. längere Zeit zur Entfernung von HCl auf 90° erhitzt. Danach füllte man auf 50 ml mit Wasser auf und entfernte die Schwefelsäure durch Zufügen von Ba(OH)₂ bis auf pH = 6,5. Das nach Einengen der Lösung²⁴⁾ auf übliche Weise dargestellte Prolinreineckat [40] zeigte denselben Smp. wie parallel hergestelltes L-Prolinreineckat und gab im Gemisch mit demselben keine Erniedrigung des Smp. Die präparative Isolierung von Prolinreineckat und L-Isoleucin aus dem Dihydrozizyphin wurde auf analoge Art durchgeführt. Auch hier wurde CO₂ nachgewiesen.

6. *Quantitative Bestimmung des Prolins in Zizyphin.* 100 mg Dihydrozizyphin (II) (1/6 Millimol) wurden 17 Std. mit 5 ml eines Gemisches von konz. HCl-CH₃COOH-H₂O (12:4:4) bei 116° im geschlossenen Rohr hydrolysiert. Nachher dampfte man i. V. ab und nahm in 10 ml H₂O auf. Zur Umwandlung der α-Aminosäuren versetzte man mit 8 ml einer 6M NaNO₂-Lösung und 4 ml Eisessig. Nach 1 Std. Stehen bei Zimmertemperatur fügte man 70 ml konz. Salzsäure zu, engte i. V. am Wasserbad auf 10 ml ein, gab nochmals dieselbe Menge Salzsäure dazu und dampfte i. V. bis zur Trockne ein. Dann nahm man in genau 100 ml H₂O auf. Zu 5 ml dieser Lösung gab man 5 ml Eisessig und 5 ml saures Ninhydrinreagens (frisch hergestellt aus 125 mg Ninhydrin, 3 ml Eisessig und 2 ml 6M H₃PO₄ durch kurzes Erhitzen auf 70°), liess 1 Std. im siedenden Wasserbad stehen und schüttelte dann den gebildeten tiefroten Farbstoff mit 5 ml Benzol aus. Die benzolische Lösung wurde bei 515 nm photometriert und mit einem Prolinstandard (38,5 mg Prolin = 1/3 Millimol wurden denselben obigen Bedingungen unterworfen) verglichen. Die Standardlösung zeigte eine genau doppelt so hohe Extinktion. Daraus folgte das Vorliegen von einem Prolinrest in der Zizyphin-Molekel.

7. *Gewinnung von IV (Azlacton), von IX und von X (Indolderivat) nach saurer Hydrolyse von Dihydrozizyphin (6N Salzsäure).* 0,6 g Dihydrozizyphin erhitzte man mit 120 ml 6N Salzsäure 14 Std. zum Sieden. Nach Abdampfen i. V. wurde der Rückstand in 100 ml Wasser aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Danach wurde mit Na₂CO₃ das pH auf 9 eingestellt. Nach dreimaligem Ausschütteln mit je 200 ml Chloroform und Trocknen des Auszuges über Na₂SO₄ hinterblieben 15 mg Rückstand. Acetylierung mit Acetanhydrid-Pyridin und Destillation des Acetylierungsproduktes bei 0,05 Torr (150°) lieferte 17 mg X, Smp. 107–109° (vgl. S. 427).

Die wässrige Phase lieferte nach Eindampfen i. V. einen Salzkückstand, der nach gründlicher Trocknung mit 20 ml Acetanhydrid und 5 ml Pyridin versetzt und kurze Zeit auf 70° erwärmt wurde. Dann liess man 14 Std. stehen, verjagte das Acylierungsgemisch i. V., nahm den Rückstand in Äther auf und destillierte:

Die *erste Fraktion* (80–90°/0,01 Torr) lieferte ein stark lichtbrechendes Öl, das nach Filtrieren durch Kieselgel (0,08 mm, MERCK) mit Benzol-Petroläther (100:2) als Lösungsmittel 70 mg IV ergab.

C₁₂H₁₉O₂N (209,29) Ber. C 68,86 H 9,15 N 6,69% Gef. C 69,22 H 9,24 N 6,43%

Physikalische Eigenschaften: Massen-Spektrum: MG = 209. – IR.-Spektrum (CHCl₃):

Lacton-C=O: 1760 cm⁻¹; -C=N-: 1660 cm⁻¹ (schwach). – NMR.-Spektrum: 1 Vinylproton: Doppelbande gleicher Intensität bei 5,52 δ und 5,33 δ. – UV.-Spektrum: λ_{max} 296 nm (ε = 14 300) (Feinsprit).

Chemisches Verhalten: Gegen C(NO)₄ ist IV schwach positiv. – Nach stark saurer Hydrolyse von IV in einem HCl-H₂O-CH₃COOH-(12:4:4)-Gemisch (unter den beim Zizyphin angewandten Bedingungen) liess sich Isoleucin dünnschichtchromatographisch eindeutig identifizieren. – Beim Stehen an der Luft tritt bereits nach 24 Std. weitgehende Polymerisation zu weissen amorphen Produkten ein.

Das Azlacton IV liess sich ebenfalls aus reinem L-(N,N-Dimethylisoleucyl)-L-isoleucin-äthylester(III) bei analoger Behandlung in 40-proz. Ausbeute isolieren.

Die *zweite Fraktion* ging bei 170–180°/0,01 Torr über und ergab 30 mg eines kristallinen Produktes. Nach dem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther resultierten 20 mg IX (8%) mit Smp. 82°; Misch-Smp. mit dem auf Seite 426 beschriebenen Phenyläthylaminderivat ohne Depression.

²⁴⁾ Eine davon entnommene Probe zeigte ein $[\alpha]_D^{25} = -30^\circ$ (in H₂O; c = 2).

8. *Alkalische Hydrolyse von IV (Isolierung von rac. 3-Methylvaleriansäureamid)*. 88 mg IV nahm man in 20 ml Äthanol-Wasser (1:1) auf, brachte mit Soda auf pH = 11 und erhitzte 2 Std. auf dem siedenden Wasserbad. Danach blieb das Reaktionsgemisch noch 14 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Nach Verjagen des Lösungsmittels i. V. und Wiederaufnahme in Wasser zog man mehrmals mit Chloroform aus. Das aus dem Chloroform gewonnene Rohprodukt wurde im H. V. (0,001 Torr, Badtemp. 100–120°) destilliert. Dem so erhaltenen, weitgehend kristallisierten Produkt entzog man durch Auftragen auf Ton die letzten öligen Begleitstoffe. Durch Sublimation (0,001 Torr/90°) erhielt man 14 mg (30%) 3-Methylvaleriansäureamid vom Smp. 124–125° (Lit. [41]: Smp. 125°). Das Massen-Spektrum zeigt die intensive Molekularspitze m/e 115 und ebenso die erwarteten Fragmente. IR.-Spektrum: für NH_2 charakteristische Doppelbande bei 3420 cm^{-1} und 3560 cm^{-1} , Carbonylbande bei 1670 cm^{-1} .

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{ON}$ (115,17) Ber. C 62,57 H 11,38% Gef. C 62,45 H 11,37%

II. Reaktionen zur Ermittlung des chromophoren Systems (trockene Destillation, alkalische Hydrolysen)

1. *Trockene Destillation von Zizyphin (I)*. 0,3 g Base wurden in einem Sublimationsrohr 20 Min. auf 260° erhitzt. Anschliessend legte man ein Vakuum (0,05 Torr) an und erhitzte allmählich im Metallblock bis auf 330°. Das so erhaltene Destillat bestand aus 3 Zonen.

Die vorderste Zone A stellte ein leichtflüssiges, bräunliches Öl von picolinähnlichem Geruch dar (positiv gegen Pikrinsäure, negativ gegenüber BrCN).

Die Mittelzone B sowie die Endzone C stellten sehr zähflüssige bis glasig spröde Massen dar.

Bearbeitung der Zone A. Nach Aufnahme in 1 ml 1N KOH und Ausäthern der basischen Anteile leitete man in die alkalische Lösung CO_2 ein und ätherte wieder aus. Der letztere Ätherrückstand zeigte starken Phenolgeruch. Man destillierte im Sublimationsrohr bei 0,05 Torr und 100°. Im Massen-Spektrum zeigte dieses nicht kristallisierende Phenol eine Molekularspitze von m/e 138 sowie Fragmente für CH_3- und $\text{CH}_3\text{O}-$. Das Vorliegen eines Methoxy-methyl-phenols wurde damit nahegelegt. Zur Gewinnung grösserer Mengen dieses Phenols wurden 2 g der Base I in 4 aliquoten Anteilen der obigen Behandlung unterworfen. Man erhielt so 25 mg des phenolischen Produktes, welches noch über Zn-Staub destilliert wurde. Es resultierten 20 mg V (3-Methyl-4-methoxyphenol).

Im NMR.-Spektrum zeigten sich die zu erwartenden 3 Absorptionsbanden gleicher Intensität für $\text{CH}_3\text{O}-$, CH_3-Ar und für 3 aromatische Protonen. Im Dünnschichtchromatogramm (Laufmittel: Benzol-Methanol-(95:5)) erwies sich das Produkt als einheitlich ($R_f = 0,5$). Entwickelt wurde durch Besprühen mit 50-proz. Schwefelsäure und 10 Min. langes Erhitzen auf 130°: gelbbraun gefärbte Flecken, die im UV. eine starke Orange-Fluoreszenz zeigten.

Dasselbe Verhalten zeigte das zum Vergleich hergestellte zweite mögliche Isomere mit *p*-Stellung der beiden Sauerstoffatome, das 2-Methyl-4-methoxyphenol (Smp. 71°). V liess sich jedoch nicht mit diesem kristallisationsfreudigen Phenol zur Kristallisation bringen. Die Konstitution von V folgt schliesslich eindeutig durch seine Korrelierung mit VIII (vgl. S. 425).

Abbau von V mit FeCl_3 (oxydative Demethylierung und anschliessende Reduktion mit Zn-Staub): 4 mg wurden mit 2 ml 3-proz. FeCl_3 -Lösung 5 Min. zum Sieden erhitzt. Anschliessend trieb man die Chinonanteile (Toluchinon) mit Wasserdampf über. Das leicht gelb gefärbte Destillat reduzierte man mit einer Spur Zn-Staub und einigen Tropfen Essigsäure, wobei die erwartete Entfärbung eintrat. Nach dem Ausäthern hinterliess die Ätherphase eine kristalline Masse, die zum grössten Teil i. V. sublimierte: Kristalle vom Smp. 120–122°; Misch-Smp. mit authentischem Toluhydrochinon ohne Erniedrigung.

Die in der ersten Ätherphase befindlichen basischen Stoffe wurden mit verdünnter Salzsäure in ihre Salze überführt und letztere nach entsprechender Trocknung i. V. (150–180°/0,05 Torr) sublimiert. Man erhielt so 12 mg eines Hydrochlorids, das wegen seiner grossen Hygroskopizität nicht analysiert werden konnte. Im Massen-Spektrum fiel als markantestes Bruchstück m/e 114 auf.

Bearbeitung der Mittelzone B. Diese Zone war z. T. kristallisiert. Nach Behandlung mit Äther blieben die Kristalle zurück (VI). Nach Sublimation zeigten sie den Smp. 255–260° (Zers.). Das Produkt ist in verdünnter Salzsäure und Natronlauge unlöslich, in konzentrierter Schwefelsäure hingegen unter Gelbfärbung löslich. Das Massen-Spektrum und das IR.-Spektrum waren mit demjenigen von authentischem Pyrocoll identisch.

Die *Endzone C* stellt eine phenolische Substanz dar, die bei 240–260°/0,05 Torr übergeht. Sie wurde nicht mehr weiter untersucht.

2. *Solvolyse von Zizyphin (I) mit KOH/CH₃OH; Isolierung von VII und VIIa.* Die Lösung von 730 mg Zizyphin (I) in 15 ml CH₃OH und 10 ml 20-proz. KOH wurde unter Rückfluss gekocht. Nach 3 Std. war deutlich der Geruch von NH₃ feststellbar. Nach 24 Std. arbeitete man wie folgt auf: Nach wiederholtem Ausschütteln mit Äther zur Entfernung der basischen und neutralen Anteile säuerte man die wässrige Phase an, wobei starke Trübung auftrat. Das ausgeschiedene Produkt zog man mit Äther aus. Der Rückstand dieses Ätherextraktes ist i. V. bei 250–260° destillierbar. Das Destillat, dessen Lösungen im UV.-Licht eine intensiv blaue Fluoreszenz zeigten, sah im Dünnschichtchromatogramm sehr uneinheitlich aus.

Durch Chromatographie von 0,1 g dieses Materials an einer Säule ($d = 1,5$ cm; $h = 20$ cm) von 10 g Kieselgel (Korngrösse 0,08 mm) und Elution mit Benzol-Methanol-(9:1)-Gemisch (es wurden Fraktionen zu 20 ml aufgefangen) erhielt man aus der 6. Fraktion 23 mg Substanz, die sich im Dünnschichtchromatogramm als weitgehend einheitlich erwies.

Der Abdampfrückstand der 7. Fraktion betrug 35 mg, verhielt sich aber bei der Untersuchung auf der Dünnschicht bereits sehr uneinheitlich. Daher wiederholte man mit dieser Fraktion nochmals die Chromatographie nach genau denselben Bedingungen. So konnten in der 5. Fraktion noch 10 mg einer Substanz erhalten werden, die sich auf der Dünnschicht gleich wie obige Fraktion 6 verhielt. Nach Vereinigen dieser beiden Fraktionen destillierte man nochmals bei 250°/0,05 Torr und erhielt so 30 mg VII.

Die Charakterisierung dieses Produktes ergibt sich hauptsächlich aus dem Massen-Spektrum. Die Molekularspitze liegt bei m/e 286. Viele Fragmente weisen auf eine *enge* Beziehung zu V hin.

UV.-Spektrum von VII: λ_{max} 255 nm ($\epsilon = 23300$); λ_{max} 306 nm ($\epsilon = 9050$) (Feinsprit).

VII acetylierte man in üblicher Weise mit Acetanhydrid-Pyridin. Nach Entfernung des Acylierungsgemisches i. V. destillierte man das Acetylprodukt VIIa bei 190–200°/0,05 Torr als zähflüssiges Produkt, das keine Fluoreszenz mehr zeigte und sich im Dünnschichtchromatogramm [Benzol-Äther-(1:1)] einheitlich verhielt. Massen-Spektrum: MG = 370. Das NMR.-Spektrum zeigt zwei CH₃CO-, zwei CH₃O-, 6 aromatische Protonen, 2 Protonen entsprechend -CH₂Ar und 2 Vinylprotonen, entsprechend Ar-CH=CH-an.

3. *Solvolyse von Zizyphin (I) mit C₂H₅O[⊖]/C₂H₅OH; Bildung von VIII.* 640 mg (1,05 mMol) Zizyphin (I) wurden zu einer Lösung von 1,15 g Natrium in 10 ml Äthanol (50 mMol C₂H₅ONa) gegeben. Man kochte 6 Std. unter Rückfluss. Nach kurzer Zeit konnte man bereits NH₃ am Geruch wahrnehmen. Nach Beendigung der Reaktion fügte man 10 ml Wasser hinzu und liess über Nacht stehen. Nach Abdampfen i. V. nahm man den Rückstand in Wasser auf (20 ml), säuerte an, stellte das pH auf 8 ein und ätherte mehrmals aus. Die gelb gefärbte Ätherphase wurde 3mal mit 100 ml 1N Salzsäure ausgeschüttelt, wobei fast die gesamte Färbung in die Wasserphase übergang. Nach Trocknung der Ätherlösung destillierte man den daraus erhaltenen Rückstand bei 150–200°/0,05 Torr. Nach einigen Tagen war teilweise Kristallisation eingetreten. Nach Einziehenlassen der öligen Anteile in Ton wurde der noch klebrige kristalline Rückstand mit etwas Petroläther-Äther (1:1) zur Entfernung der letzten öligen Anteile digeriert. Nach erneuter Destillation (145–160°/0,05 Torr) kristallisierte man aus Äther-Petroläther um. Ausbeute: 10 mg β -(2-Methoxy-5-hydroxy-phenyl)-äthylalkohol (VIII) mit Smp. 100°.

C₉H₁₂O₃ (168,10) Ber. C 64,27 H 7,19% Gef. C 63,91 H 7,26%

4. *Alkalische Hydrolyse von Zizyphin (I) in Gegenwart von NaBH₄.* 633 mg Zizyphin (I), 50 ml Methanol, 50 ml 2N NaOH und 1 g NaBH₄ wurden 16 Std. unter Rückfluss gekocht. Auch hier war der Geruch von NH₃ deutlich festzustellen. Anschliessend wurde i. V. weitgehend eingedampft und in Wasser aufgenommen. Zur Zerstörung überflüssigen Reduktionsmittels fügte man Eisessig und etwas Salzsäure zu und dampfte nochmals i. V. ein, nahm wieder in Wasser auf und stellte das pH auf 9 ein. Nun schüttelte man einmal mit 100 ml Chloroform, einmal mit 100 ml Essigester und noch zweimal mit je 100 ml Chloroform aus. Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über Na₂SO₄. Der Rückstand (180 mg) wurde an einer Säule ($d = 1,6$ cm; $h = 13$ cm) von 12 g Kieselgel MERCK (unter 0,08 mm Korngrösse) chromatographiert. Eluiert wurde mit Äther-Chloroform (1:1): 1. Fr. (40 ml) 5 mg; 2. Fr. (50 ml) 100 mg; 3. Fr. (50 ml) 2 mg.

Der Rückstand der 2. Fraktion kristallisierte zur Gänze: Smp. 98°, Misch-Smp. mit obigem VIII ohne Depression, Ausbeute: 65%.

5. *Konstitutionsbeweis für VIII durch unabhängige Synthese.* 24 g 1-Allyloxy-4-benzoyloxy-benzol [14] wurden mit 100 g 20-proz. Kalilauge und 0,5 l Alkohol 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Danach wurde der Alkohol i. V. verjagt und der Rückstand in Wasser aufgenommen, angesäuert und mit Sodalösung auf pH = 9 eingestellt. Ausschütteln des Hydrochinonmonoallyläthers (Smp. 41°) mit Äther. Anschliessend acetylierte man mit einem Gemisch aus 75 ml Ac₂O und 25 ml Pyridin 1,5 Std. auf dem siedenden Wasserbad, arbeitete in üblicher Weise auf und erhielt 15 g der Acetylverbindung (Sdp. 147°/12 Torr). Diese erhitzte man 2,5 Std. auf 215° und 10 Min. auf 275°. Die Destillation bei 173–175°/12 Torr lieferte 11 g 2-Allyl-4-acetoxy-phenol.

Zur Methylierung dieses Phenols wurde die gesamte Menge (11 g) in 40 ml frisch über K₂CO₃ destilliertem Aceton gelöst. Dazu fügte man 25 g CH₃J und 24 g frisch geglühtes, feinst zermahlenes K₂CO₃ und hielt 4 Std. lang im Wasserbad auf dem Siedepunkt. Nach Eingiessen in Wasser und Ausäthern erhielt man 9,5 g 1-Allyl-2-methoxy-5-acetoxy-benzol mit Sdp. 155°/12 Torr.

4,4 g des Methyläthers löste man in 250 ml Chloroform und leitete bei Zimmertemperatur Ozon (1100 ml O₂-O₃/Min.; O₃-Gehalt: 3%) 30 Min. lang ein. Anschliessend fügte man etwas Wasser zu, erwärmte auf ca. 40° und schüttelte kräftig durch. Nach Verjagen des Chloroforms i. V. verblieb ein öliger Rückstand, der mit ges. NaHCO₃-Lösung versetzt wurde, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die ungelösten Anteile nahm man in Äther auf, trocknete über Na₂SO₄, dampfte ein und destillierte den Rückstand im Kugelrohr, unter Vorschaltung einer Kältefalle, bei 130–150°/0,005 Torr, wobei teilweise Zersetzung zu beobachten war. So wurde 1 g eines viskosen Öls erhalten, das auf Grund des IR.-Spektrums den gewünschten Phenylacetaldehyd enthalten musste. Da zum Teil auch Entacetylierung eingetreten war, führte man eine Nachacetylierung mit 4 ml Acetanhydrid und 1 ml Pyridin durch. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 114 mg des nachacetylierten Produktes mit 0,5 g LiAlH₄ im abs. Äther umgesetzt. Nach Abklingen der Hauptreaktion wurde noch 10 Min. auf dem Wasserbad unter Rückfluss erhitzt. Nach Zersetzung mit feuchtem Äther, Wasser und schliesslich verdünnter Salzsäure enthielt die getrocknete Ätherphase ein öliges Reaktionsprodukt, das bei 120–150°/0,05 Torr destillierte und teilweise kristallisierte. Nach Entfernung der öligen Anteile auf Ton und verlustreichem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther resultierten 15 mg des erwarteten β-(2-Methoxy-5-hydroxy-phenyl)-äthylalkohols (VIII) vom Smp. 96–97°, Misch-Smp. mit dem aus Zizyphin (I) erhaltenen Abbauprodukt VIII ohne Erniedrigung. Die zwei Präparate ergaben ferner identische Massen-Spektren.

6. *Synthese von VIIIa [β-(2-Hydroxy-5-methoxy-phenyl)-äthylalkohol].* 10 g Hydrochinonmonomethyläther wurden in 50 ml über Kaliumcarbonat getrocknetem Aceton bei Gegenwart von 30 g K₂CO₃ und der 2fachen stöchiometrischen Menge Allylbromid 4 Std. auf dem Wasserbad gekocht. Nach dem Eingiessen in Wasser und Ausäthern wurden 10 g Hydrochinon-methyl-allyläther (Sdp. 150°/12 Torr) isoliert. Die gesamte Menge wurde in der für CLAISEN-Umlagerungen üblichen Weise unter Rückfluss erhitzt, wobei die Temperatur langsam von 250 auf 280° anstieg. Das resultierende 2-Allyl-4-methoxy-phenol ging bei 160–163°/12 Torr über. Von dem daraus durch Acetylierung mit Ac₂O-Pyr. in üblicher Weise gewonnenen Acetylierungsprodukt (Sdp. 165°/12 Torr) wurden 2 g in 250 ml CHCl₃ gelöst und 30 Min. mit 3-proz. Ozon in O₂ bei Zimmertemperatur (1100 ml/Min.) behandelt. Anschliessend wurde die Lösung mehrmals mit warmem (30–40°) Wasser geschüttelt und über Na₂SO₄ getrocknet. Der Abdampfückstand, der auf Grund von Analysen, IR.-Spektren und Massen-Spektren ein Gemisch von 2-Hydroxy-5-methoxy-phenyl-essigsäure (ca. 80%) und deren Lacton (ca. 20%) darstellte, wurde zwecks gänzlicher Lactonisierung bei 160–170°/0,05 Torr destilliert. Dabei entstand quantitativ das Lacton obiger 2-Hydroxy-5-methoxy-phenyl-essigsäure, welches nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 95° schmolz. Das IR.-Spektrum zeigte als charakteristischste Bande die erwartete >C=O-Frequenz bei 1785 cm⁻¹.

Lacton C₉H₈O₃ (164,15) Ber. C 65,85 H 4,91% Gef. C 65,67 H 4,69%

0,2 g dieses Lactons wurden in 30 ml abs. Äther gelöst und mit 1 g LiAlH₄ 1 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach der wie für VIII durchgeführten Aufarbeitung wurden 70 mg VIIIa erhalten; nach dem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther Smp. 88–89°.

C₉H₁₂O₃ (168,19) Ber. C 64,27 H 7,19% Gef. C 64,23 H 6,80%

Das Gemisch von VIIIa und VIII zeigte eine erhebliche Smp.-Depression (68–76°). Das Massen-Spektrum von VIIIa zeigte gegenüber demjenigen von VIII beträchtliche Unterschiede.

7. *Alkalische Hydrolyse von Dihydrozizyphin (II); Bildung von III und IX.* 1,15 g Dihydrozizyphin wurden in 25 ml Äthanol gelöst. Dazu gab man 25 ml 50-proz. Natronlauge und hielt 17 Std. auf dem Siedepunkt. Nach Neutralisation mit halbkonzentrierter Salzsäure, Eindampfen i. V. und Wiederaufnehmen in Wasser filtrierte man die abgeschiedene Kieselsäure ab, brachte das Filtrat i. V. zum Trocknen und laugte den Trockenrückstand mehrmals mit abs. Alkohol aus. Auf diese Weise wurde die organische Substanz weitgehend von NaCl abgetrennt. Der Trockenrückstand der alkoholischen Lösung (1,19 g) wurde auf dem siedenden Wasserbad 3,5 Std. mit 20 ml Ac₂O-Pyridin (1:1) acetyliert, danach auf Wasser gegossen und das Ganze 16 Std. stehengelassen. Der nach Eindampfen i. V. resultierende Rückstand wurde in 100 ml abs. Alkohol aufgenommen und zur Entfernung der letzten Wasserreste wieder eingedampft. Nach neuerlichem Aufnehmen in 100 ml abs. Alkohol leitete man HCl-Gas bis zur Sättigung ein (Veresterung der Carboxylgruppen).

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht
1	Äther	50 ml	116 mg
2	Äther	50 ml	45 mg
3	Äther	50 ml	20 mg
4	CH ₂ Cl ₂	60 ml	9 mg
5	CHCl ₃	50 ml	3 mg
6	CHCl ₃	50 ml	105 mg
7	CHCl ₃	50 ml	14 mg
8	CH ₃ OH	50 ml	125 mg

Nach erneutem Eindampfen i. V. versetzte man mit ges. NaHCO₃-Lösung und schüttelte mehrmals mit Chloroform aus. Der Eindampfrückstand der Chloroformlösung (525 mg) wurde an einer Säule ($d = 1,1$ cm; $h = 10$ cm) von 15 g Al₂O₃ («WOELM», neutral, Akt.-Stufe II) chromatographiert.

Die Fraktionen 6 und 7 stellen im wesentlichen N-Acetylprolin-äthylester dar. Dies folgt aus Massen-Spektrum, IR.-Spektrum sowie aus der sauren Hydrolyse, bei der man ausschliesslich Prolin fand.

Fraktionen 1–5 stellen hauptsächlich (N,N-Dimethylisoleucyl)-isoleucin-äthylester (III) dar. Dies folgt aus der weitgehenden Ähnlichkeit im Massen-Spektrum und IR.-Spektrum mit III (S. 421). Da jedoch unter alkalischen Hydrolysenbedingungen Epimerisierung am Amino-C-Atom eintritt, war ein sterisch uneinheitlicher Dipeptidester zu erwarten.

Fraktion 8 stellt ein phenolisches Produkt dar. Dieses wurde nochmals acetyliert (mit Ac₂O-Pyridin). Nach 16 Std. wurde auf Wasser gegossen, 3 Std. stehengelassen, i. V. eingedampft und an einer Säule ($d = 0,8$ cm, $h = 10$ cm) von 5 g Al₂O₃ («WOELM», neutral, Akt.-Stufe II) chromatographiert.

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht
8a	CHCl ₃	50 ml	50 mg
8b	CHCl ₃	50 ml	—
8c	CHCl ₃	50 ml	—
8d	CH ₃ OH	50 ml	50 mg (nicht untersucht)

Fraktion 8a wurde bei 0,05 Torr und 200° destilliert. Man erhielt so 32 mg weitgehend kristallines Produkt. Nach Entfernung der öligen Anteile auf Ton wurde aus Äther-Petroläther umkristallisiert, wobei 25 mg (5%) weisse Nadeln von IX erhalten wurden Smp. 84–86°. UV.-Spektrum: λ Schulter 223 nm ($\epsilon = 7200$); λ_{max} 280 nm ($\epsilon = 2300$) Feinsprit. IR.-Spektrum: Ar-OCOCH₃,

1760 cm^{-1} ; $-\text{NH}-\text{COCH}_3$ 1660 cm^{-1} ; für $>\text{NH}$ 3450 cm^{-1} . NMR.-Spektrum: $\text{CH}_3\text{O}-$: 3,83 δ ; $-\text{OCOCH}_3$: 1,91 δ ; $-\text{NHCOCH}_3$: 2,26 δ ; 3 arom. Protonen 6,85 δ ; 4 Protonen für $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$: 2,6 δ bis 3,7 δ .

$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{N}$ (251,27) Ber. C 62,14 H 6,82 N 5,57% Gef. C 61,87 H 6,90 N 5,51%

8. *Umwandlung von IX in 5-Acetoxyindol (X)*. 35 mg IX wurden in 3 ml Salzsäure (1:1) 16 Std. bei 115° im geschlossenen Rohr belassen. Nach Eindampfen i. V. brachte man mit NaHCO_3 - Na_2CO_3 -Lösung auf pH = 10. Anschliessend schüttelte man 3mal mit je 50 ml Chloroform aus, trocknete über Na_2SO_4 und acetylierte den blaurötlichen Rückstand mit Ac_2O -Pyridin (20 Std. bei Raumtemperatur). Nach dem Abdampfen des Acylierungsgemisches i. V. ging das Reaktionsprodukt i. HV. bei 150° über. Ausbeute: 3 mg 5-Acetoxyindol (X). Smp. 107–109°. IR.-Spektrum: Typisch für Indol, phenol. Acetyl und $>\text{NH}$. Massen-Spektrum: MG = 175. EHRLICH-Reaktion: stark positiv.

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$ (175,18) Ber. C 68,56 H 5,18% Gef. C 68,32 H 5,09%

Mit Alkali tritt intensive Violettfärbung ein. In der Literatur [15] ist das 5-Acetoxyindol mit einem Smp. 113–114° und denselben Reaktionen gegenüber Alkali beschrieben.

III. Verknüpfungsart und -stelle des aromatischen Teils mit der (N, N-Dimethylisoleucyl)-isoleucin-Kette

1. *Reduktion von Dihydrozizyphin (II) mit LiAlH_4* . 560 mg Dihydrozizyphin (II) in 200 ml abs. Diisopropyläther kochte man 20 Std. mit 2 g LiAlH_4 . Anschliessend wurde vorsichtig zuerst mit feuchtem Äther und Wasser, dann mit verdünnter Salzsäure versetzt. Darauf wurden 2,2 Mol Weinsäure pro Mol LiAlH_4 zugegeben und alkalisch gemacht. Die Base wurde durch mehrmaliges Ausschütteln in Äther aufgenommen, die Lösung über KOH getrocknet, eingedampft und der Rückstand destilliert. Bis 165°/0,005 Torr destillierten geringfügige Beimengungen (10 mg). Ein Teil der verbleibenden Hauptmenge (110 mg) wurde bei 215–220° destilliert und anschliessend an einer Säule ($d = 0,8$ cm, $h = 5$ cm) von 3,6 g Al_2O_3 («WOELM», neutral, Akt.-Stufe I) chromatographiert.

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht
1	Benzol	50 ml	19 mg
2	Benzol	50 ml	
3	Benzol	50 ml	
4	Benzol	50 ml	
5	Benzol	50 ml	
6	$\text{C}_6\text{H}_6-\text{CH}_3\text{OH}$ (99:1)	50 ml	75 mg

Das aus der 6. Fraktion erhaltene Produkt wurde nochmals bei 210–215°/0,001 Torr destilliert und ergab XI als sehr zähes und leicht gelb gefärbtes Öl. $[\alpha]_D^{20} = -132^\circ$ (in CHCl_3 , $c = 0,9$). UV.-Spektrum (Fig. 4, S. 412) identisch mit dem UV.-Spektrum von Dihydrozizyphin oder eines Hydrochinondialkyläthers. IR.-Spektrum: frei von $>\text{C}=\text{O}$ -Banden. NMR.-Spektrum: $-\text{OCH}_3$: 3,75 δ ; $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 2,3 δ ; $4\equiv\text{C}-\text{CH}_3$: 0,82–1 δ ; 3 arom. Protonen: 6,75 δ .

$\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{O}_2\text{N}_5$ Ber. C 71,05 H 10,66 O 5,74 N 12,56%
(557,84) Gef. „ 70,68 „ 10,87 „ 5,82 „ 12,42%

2. *Acetylierung von XI (Bildung von XIa)*. 150 mg XI wurden 12 Std. mit Acetanhydrid-Pyridin bei Z. T. stengelassen. Danach goss man in Wasser ein, liess noch 2 Std. stehen und brachte mit Sodalösung auf pH = 9,5. Es schied sich ein amorphes Produkt ab. Nach Waschen und Trocknen betrug die Menge 160 mg.

Chromatographic an einer Säule ($d = 0,9$ cm, $h = 8$ cm) von 5 g Al_2O_3 («WOELM», neutral, Akt.-Stufe I).

Das Produkt aus den Fraktionen 6 und 7 wurde durch langes Evakuieren im siedenden Wasserbad sorgfältig von anhaftendem Lösungsmittel befreit. So erhielt man XIa als farbloses

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht
1	Benzol	50 ml	—
2	Benzol	50 ml	—
3	Benzol	50 ml	Spuren
4	C ₆ H ₆ -CH ₂ Cl ₂ (1:1)	50 ml	Spuren
5	C ₆ H ₆ -CH ₂ Cl ₂ (1:1)	50 ml	Spuren
6	CH ₂ Cl ₂	50 ml	} 60 mg
7	CH ₂ Cl ₂	50 ml	
8	CH ₂ Cl ₂	50 ml	
9	CHCl ₃	50 ml	25 mg

Glas. $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ (in CHCl₃, $c = 1$); $[\alpha]_D^{20} = -65^\circ$ (in 0,1N HCl, $c = 1$). NMR.-Spektrum: 3 ar. Protonen: 6,75 δ ; -OCH₃: 3,76 δ ; -N(CH₃)₂: 2,3 δ ; 2 CH₃CO-: 2,35 δ ; 4 \equiv C-CH₃: 0,8-1 δ .

C₃₇H₆₃O₄N₅ Ber. C 69,22 H 9,89 N 10,91 CH₃CO 7,47%
(641,94) Gef. „ 69,00 „ 9,57 „ 10,55 „ 7,74%

3. *Perjodsäureabbau von XI*. 240 mg Rohprodukt von XI löste man in 4 ml 10-proz. Schwefelsäure, schüttelte etwaige Neutralteile mehrmals mit Äther aus und verjagte den in der wässrigen Phase gelösten Äther i. V. Dann brachte man auf das doppelte Volumen, stellte mit CH₃COONa auf pH = 5 ein und setzte eine Lösung von 200 mg Na₂JO₄ in 5 ml Wasser, etwas verdünnter Schwefelsäure und CH₃COONa (pH = 5) zu. Es trat sofort der typische Geruch nach Valeraldehyd auf. Nach 1 Std. Stehen bei Zimmertemperatur destillierte man das Gemisch der Aldehyde mit Wasserdampf (eine Probe des Destillates reagierte stark positiv gegenüber fuchsinschwefeliger Säure). Zum Destillat wurde eine frisch bereitete Lösung von Dinitrophenylhydrazin in halbkonzentrierter Salzsäure gegeben. Die entstandene Fällung filtrierte man nach 48 Std. ab, löste sie in Chloroform und trocknete über Na₂SO₄. Eine Probe davon ergab bei der Untersuchung im Dünnschichtchromatogramm einwandfrei das Vorliegen von Formaldehyd-dinitrophenylhydrazon und Isovaleraldehyd-dinitrophenylhydrazon. Entwickelt wurde mit Benzol-Petroläther-(3:1)-Gemisch.

Weitere Bearbeitung des rohen Reaktionsgemisches zur präparativen Isolierung der beiden Dinitrophenylhydrazone: Man trug obige eingeengte Chloroformlösung (1,5 ml) auf eine Dünnschichtplatte (Schichtdicke: 1 mm) auf und entwickelte mit Benzol-Petroläther (3:1). Dabei trat wohl noch keine Auftrennung infolge zu starker Belastung der Platte ein, hingegen blieb das gesamte Dinitrophenylhydrazin an der Startlinie zurück. Nach Elution der Hydrazone trug man dieselben in Chloroform gelöst auf drei Dünnschichtplatten (Schichtdicke: 1 mm) auf und entwickelte nochmals mit dem gleichen Lösungsmittelsystem. Hierbei konnte eine deutliche Trennung der beiden Hydrazone erreicht werden. Die hellgelbe Zone mit Rf = 0,15 stellte das Dinitrophenylhydrazon des Formaldehyds dar. Nach Elution mit Chloroform und Sublimation des durch Abstreichen auf Tonplatten von öligen Anteilen befreiten Kristallisates i. V. schmolzen die Kristalle bei 160-163,5°; Misch-Smp. mit authentischem Formaldehyd-dinitrophenylhydrazon (Smp. 166°) [42] ohne Depression. Die orange gefärbte Zone mit Rf = 0,3 wurde ebenso mit Chloroform eluiert, die Lösung wurde eingedampft und der kristalline Rückstand nach dem Trocknen über Ton, i. HV. sublimiert; Smp. 128,5-131° (Smp. des aus L-Isoleucin nach LÖHR [17] erhaltenen D-Isovaleraldehyd-dinitrophenylhydrazons 129-130°), Misch-Smp. der beiden Hydrazone ohne Erniedrigung. Nochmalige Untersuchung der beiden reinen Hydrazone im Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel: Benzol-Petroläther (Sdp. 60-80°)-(3:1), ergab vollkommen gleiche Rf-Werte. $[\alpha]_D^{23} = +25,5^\circ$ (in CHCl₃, $c = 0,34$).

Direkt aus L-Isoleucin nach LÖHR [17] dargestelltes Dinitrophenylhydrazon: $[\alpha]_D^{22} = +23^\circ$ (in CHCl₃, $c = 0,42$).

Massen-Spektrum: Molekularspitze: m/e 266; Hauptfragment ($M-29$) = m/e 237.

C₁₁H₁₄O₄N₄ (266,25) Ber. C 49,62 H 5,30 N 21,04% Gef. C 49,93 H 5,30 N 21,31%

IV. Strukturermittlung der restlichen Molekelbestandteile und deren Verknüpfung mit dem aromatischen Teil

1. *Ozonolyse von Dihydrozizyphin und anschliessende saure Hydrolyse; Nachweis des Hydroxyprolins.* 210 mg Dihydrozizyphin (II) löste man in 100 ml 80-proz. Ameisensäure. In diese Lösung wurde 3,5 Std. bei Zimmertemperatur und 4,5 Std. bei einer Temperatur von 36° elektrolytisch entwickeltes Ozon (16% O₃-Gehalt, 250 ml Gas in 5 Min.) [43] eingeleitet. Der nach dem Eindampfen i. V. erhaltene Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen und mit NH₃ etwas ammoniakalisch gemacht. Bei Zusatz von CaCl₂-Lösung trat eine deutliche Fällung von Calciumoxalat ein, welches aus der Oxydation des aromatischen Kerns stammt. Nach Filtration und Eindampfen hydrolysierte man den Eindampfrückstand mit 4 ml eines konz. HCl-H₂O-CH₃COOH-(12:4:4)-Gemisches 14 Std. unter Rückfluss. Danach wurde die Lösung mit dem Laufmittel Phenol-Wasser (75 g:25 g) dünnschichtchromatographisch untersucht [44]; Laufzeit 4 Std. Die Hauptmenge des anhaftenden Phenols entfernte man durch Überstreichen während 30 Min. mit einem warmen Luftstrom (ca. 60°). Bei der anschliessenden Anfärbung mit Ninhydrin [45] konnten Prolin und Hydroxyprolin einwandfrei identifiziert werden.

Bei einem zweiten Chromatogramm mit demselben Laufmittel fand man nach Anfärbung mit Isatin (1-proz. Lösung mit Äthanol-Essigsäure-Butanol-(5:3:50)) den erwarteten dunkelblauen Fleck des Prolins und den himmelblau gefärbten Fleck des Hydroxyprolins.

2. *Kontrollversuch mit L-Prolinanhydrid (Ozoneinwirkung).* 64 mg (0,33 mMol) L-Prolinanhydrid wurden ganz analog wie oben mit Ozon behandelt und hydrolysiert. Es konnte keine Spur von Hydroxyprolin in den Chromatogrammen festgestellt werden.

3. *Vergleich des Hydroxyprolins aus Dihydrozizyphin und Zizyphin mit dem rac. 3-Hydroxyprolin und dem rac. allo-3-Hydroxyprolin* [29]. Beide 3-Hydroxyproline geben mit Ninhydrin dieselbe Färbung wie das 4-Hydroxyprolin. Mit Isatin entsteht jedoch mit den 3-Hydroxyderivaten erst nach deutlich längerem Erhitzen auf 130° eine blasspurpurviolette Färbung.

4. *Nachweis des Δ¹-Pyrrolins.* – a) *Hydrolyse mit konz. HCl:* 0,6 g Dihydrozizyphin löste man in 60 ml konz. Salzsäure und erhitzte 16 Std. lang im Einschlussrohr auf 110°. Der Eindampfrückstand wurde mit Ba(OH)₂ alkalisch gemacht und mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Bei der darauffolgenden Destillation der halben Flüssigkeitsmenge ging eine picolinähnlich riechende Base über. Das Destillat brachte man mit verdünnter Salzsäure auf pH = 2. Nach neuerlichem Abdampfen und Wiederaufnehmen in Wasser (2 ml) zeigte eine Probe der Lösung das gleiche Verhalten auf der Dünnschichtplatte wie authentisches Δ¹-Pyrrolin [27], welches gleich vorbehandelt worden war. Entwickelt wurde mit einem [Äthanol (96-proz.)-0,1N Salzsäure-(9:1)]-Gemisch. Die Laufzeit betrug 4 Std., (Rf = 0,33). Beim Besprühen mit Ninhydrin entstanden tief purpurviolettbraun gefärbte Flecken.

Mit einer frisch bereiteten Lösung von *o*-Aminobenzaldehyd in CH₃OH zeigte eine Probe des Hydrolysenproduktes dieselbe intensive zitronengelbe Färbung wie authentisches Δ¹-Pyrrolin (Reaktion nach SCHÖPF) [28].

Das Δ¹-Pyrrolin erhält man unter analogen Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen auch aus dem Zizyphin. Die Ausbeuten sind variabel.

b) *Hydrolyse mit 40-proz. Schwefelsäure:* 1 g Dihydrozizyphin wurde mit 40 ml 40-proz. H₂SO₄ 3 Std. unter Rückfluss gekocht, dann wurde mit 10 ml H₂O verdünnt und noch 16 Std. auf dem Siedepunkt gehalten (dunkelbraune Verfärbung und CO₂-Entwicklung, festgestellt mittels Durchleiten der Gase durch Ba(OH)₂-Lösung). Anschliessend brachte man die Lösung mit Barytlauge auf pH = 6,4, wobei wieder der typisch picolinähnliche Geruch des Δ¹-Pyrrolins auftrat. Das Gesamtvolumen nach der Neutralisation betrug 1,5 l. Davon wurden in Gegenwart des BaSO₄-Niederschlags 400 ml abdestilliert. Das Destillat wurde wie oben weiter verarbeitet. Auch hier zeigte das Dünnschichtchromatogramm einwandfrei das Vorliegen von Δ¹-Pyrrolin an.

5. *Prüfung der Stabilität von authentischem Δ¹-Pyrrolin.* 1 g L-Prolin wurde nach LANGHELD [27] in Δ¹-Pyrrolin übergeführt. Das das Δ¹-Pyrrolin enthaltende Destillat (150 ml) versetzte man mit 40 ml 50-proz. H₂SO₄ und engte es unter Normaldruck auf 60 ml Volumen ein (dabei erfolgte gänzliche Zerstörung des beigemengten Pyrrols); man füllte mit 50 ml 30-proz. Schwefelsäure auf und kochte noch 16 Std. Die nachfolgende Aufarbeitung und Identifizierung des noch unverändert vorliegenden Δ¹-Pyrrolins erfolgte ganz in Analogie zum oben beschriebenen Verfahren.

SUMMARY

The structure I for Zizyphin ($C_{33}H_{49}O_6N_5$), a peptidic alkaloid isolated from the rootbark of *Zizyphus oenoplia* MILL., has been determined by chemical degradation and confirmed by N.M.R. investigation. The stereochemistry of Zizyphin has been elucidated with the exception of the configuration of the ether group of the hydroxyproline unit, which is expected to belong to the natural series.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *Helv.* **46**, 1801 (1963).
- [2] *Österr. Chem. Ztg.* **64**, 301 (1963).
- [3] MARY PAÍS, X. MONSEUR, X. LUSINCHI & R. GOUTAREL, *Bull. Soc. chim. France* **1964**, 817.
- [4] R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, *Helv.* **39**, 872 (1956).
- [5] A. STOLL, A. HOFFMANN & TH. PETRZILKA, *Helv.* **34**, 1545 (1951).
- [6] TH. WIELAND & W. SCHÖN, *Liebigs Ann. Chem.* **593**, 157 (1955).
- [7] A. KISS, J. MOLNAR & C. SANDORFY, *Bull. Soc. chim. France* **1949**, 275.
- [8] F. A. BOVEY & G. V. D. TIERS, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2870 (1959).
- [9] K. BIEMANN, J. SEIBL & F. GAPP, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 3795 (1961).
- [10] «The Chemistry of Penicillin», Princeton University Press, Princeton, New Jersey 1949. S. 730.
- [11] V. M. INGRAM, *J. biol. Chemistry* **202**, 193 (1953).
- [12] R. A. BOISSONAS, *Helv.* **34**, 874 (1951).
- [13] KENTARŌ ANZAI, *J. of Antibiotics, Ser. A.* **15**, 119 (1962).
- [14] O. N. WITT & E. S. JOHNSON, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **26**, 1909 (1893).
- [15] R. J. S. BEER, K. CLARKE, H. G. KHORANA & A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* **1948**, 1605.
- [16] L. J. BELLAMY, «The Infra-red Spectra of Complex Molecules», John Wiley & Sons, Inc., New York und Methuen & Co. Ltd., London 1954.
- [17] K. LÖHR, *Biochem. Z.* **320**, 115 (1950).
- [18] H. BROCKMANN, N. GRUBHOFER, W. KASS & H. KALBE, *Chem. Ber.* **84**, 260 (1951).
- [19] K. RANDEATH, «Dünnschichtchromatographie», Verlag Chemie GmbH., Weinheim 1962, S. 212.
- [20] H. G. BOIT, «Ergebnisse der Alkaloidchemie», Akademie-Verlag, Berlin 1961, S. 792.
- [21] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «Chemistry of Amino Acids», John Wiley & Sons, Inc., New York, London 1961, **3**, S. 2184.
- [22] HYROMASA KADROYAMA, *Nagasaki Igakkai Lasshi* **33**, 595 (1958); *Chem. Abstr.* **52**, 15633b (1958).
- [23] A. V. ROBERTSON & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 1697 (1962).
- [24] R. LUKEŠ, V. DĚDEK & L. NOVOTNY, *Chem. Listy* **52**, 654 (1958).
- [25] U. BOKLUND, *Biochem. Z.* **226**, 56 (1930).
- [26] M. R. F. ASHWORTH, R. P. DAFFERN & D. L. HAMMICK, *J. chem. Soc.* **1939**, 809; E. S. GOULD, «Mechanismus und Struktur in der Org. Chemie», Verlag Chemie, Weinheim 1962, S. 413.
- [27] K. LANGHELD, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **42**, 2360 (1909).
- [28] C. SCHÖPF & F. OECHLER, *Liebigs Ann. Chem.* **523**, 1 (1936); C. SCHÖPF & H. STEUER, *ibid.* **558**, 124 (1947).
- [29] J. C. SHEEHAN & J. G. WHITNEY, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3980 (1962); J. D. OGLE, R. B. ARLINGHAUS & M. A. LOGAN, *J. biol. Chemistry* **237**, 3667 (1962).
- [30] A. J. BIRCH, G. E. BLANCE, S. DAVID & H. SMITH, *J. chem. Soc.* **1961**, 3129.
- [31] J. H. BIRKINSHAW & Y. S. MOHAMMED, *Biochem. J.* **85**, 523 (1962).

- [32] J. C. MACDONALD, *J. biol. Chemistry* **237**, 1977 (1962).
 [33] R. J. SUHADOLNIK & R. G. CHENOWETH, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 4391 (1958).
 [34] G. DUNN, G. T. NEWBOLD & F. S. SPRING, *J. chem. Soc.* **1949**, 2586.
 [35] A. H. COOK & C. A. SLATER, *J. chem. Soc.* **1956**, 4133.
 [36] J. KAPFFHAMMER & A. MATTHES, *Z. physiol. Chem.* **223**, 43 (1934).
 [37] G. V. D. TIERS, *J. physic. Chemistry* **62**, 1151 (1958).
 [38] L. M. JACKMANN, «Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry», Pergamon Press, London, Oxford, New York, Paris 1959, S. 85.
 [39] E. v. ARX & R. NEHER, *J. Chromat.* **12**, 329 (1963).
 [40] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, «Chemistry of the Amino Acids», John Wiley & Sons, Inc., New York, London 1961. **3**, S. 2181.
 [41] S. SABETAY & J. PANOUSE, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci.* **255**, 888 (1947).
 [42] A. J. VOGEL, «Practical Organic Chemistry», 3rd Ed., Longmans, Green & Co., London, New York, Toronto 1956, S. 334.
 [43] H. BOER, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **70**, 1020 (1951); E. HARDEGGER, H. GEMPELER & A. ZÜST, *Helv.* **40**, 1819 (1957).
 [44] M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* **16** 378 (1960).
 [45] A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI & M. BRENNER, *Helv.* **44**, 2022 (1961).

Bei der Redaktion eingelaufene Bücher:

(Die Redaktion verpflichtet sich nicht zur Besprechung der eingesandten Werke)

Livres reçus par la Rédaction:

(La rédaction ne s'engage pas à publier des analyses des ouvrages qui lui sont soumis)

Analytical Chemistry of Polymers, volume XII. part III. Identification Procedures and Chemical Analysis. Edited by GORDON M. KLINE. National Bureau of Standards Washington, D. C. 566 pages, 16×23 cm. Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, New York-London. 1964. Price: sh. 124/-.

The Chemistry of Thinking. By GEORGE HUMPHREY, Ph. D., Professor Emeritus of Psychology, Oxford University, sometime Fellow of Magdalen College, Oxford, and R. V. COXON, M. D., D. Phil., Reader in Human Physiology, Oxford University. Fellow of Exeter College, Oxford, 148 pages, 15×23 cm. Charles C Thomas, Publisher, 301-327 East Lawrence Avenue Springfield, Illinois. U.S.A., 1963. Price: \$ 6.75.

Peptides, Proceedings of the Fifth European Symposium. Oxford, September 1962. Edited by G. T. YOUNG, 269 pages, 15×23 cm. Pergamon Press, Headington Hill Hall, Oxford 1963.

Principles of Organic Chemistry, second edition. By T. A. GEISSMAN, University of California, Los Angeles. 854 pages, 16×24 cm, diagrams and tables. W. H. Freeman and Company Ltd., San Francisco and London 1962. Price: sh. 35/-.

Theorie und Praxis der Gravimetrischen Analyse, Band I. Theoretischer Teil von Dr. LÁSZLO ERDEY, Professor an der Technischen Universität Budapest, Mitglied der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, 382 pages, 17×24 cm, mit 144 Abbildungen. Akadémiai Kiadó, Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest V, Alkotmány U. 21, 1964. Preis: \$ 9.-.

Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds. By HERBERT BUDZIKIEWICZ, Research Associate, Stanford University, CARL DJERASSI, Professor of Chemistry, Stanford University, DUDLEY H. WILLIAMS, Research Associate, Stanford University, 271 pages, 19×25 cm. Holden-Day Inc., San Francisco 1964. Price: \$ 8.75.

Computer Applications in Medicine. By EDWARD E. MASON, M. D., Ph. D., Professor, Department of Surgery, College of Medicine, State University of Iowa, Iowa City, Iowa, and WILLIAM G. BULGREN, M. S., Graduate Student in Mathematics, State University of Iowa, Iowa City, Iowa. 171 pages, 15×23 cm. Charles C Thomas, Publisher, 301-327, East Lawrence Avenue, Springfield, Illinois, U.S.A. 1963. Price: \$ 6.75.