

Rudolf Tschesche, Reiner Welters und Hans-Wolfram Fehlhaber

Alkaloide aus Rhamnaceen, I

## Scutianin, ein cyclisches Peptid-Alkaloid aus *Scutia buxifolia* Reiss.

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 2. September 1966)

Aus der Rinde der südamerikanischen Rhamnacee *Scutia buxifolia* Reiss. wurde als Hauptalkaloid Scutianin isoliert. Es ist ein cyclisches Peptid-Alkaloid, das die Aminosäuren *N,N*-Dimethyl-phenylalanin, Prolin, Phenylalanin und  $\beta$ -Hydroxy-leucin sowie *p*-Hydroxy-styrylamin enthält. Auf Grund chemischer und massenspektrometrischer Untersuchungen kommt ihm die Konstitution  $(\text{CH}_3)_2\text{Phe} \rightarrow \text{Pro} \rightarrow 3\text{Hyle} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{NH}-\text{CH}=\text{CH}-$   (1) zu.

*Scutia buxifolia* Reiss. ist ein in Brasilien beheimateter Baum, der zur Familie der Rhamnaceen zählt. Bei der Bevölkerung des Staates Rio Grande do Sul ist er unter dem Namen „Coronilha“ bekannt. Wäßrige Aufgüsse wendet man in der dortigen Volksmedizin zur Behandlung von Herz- und Gefäßerkrankungen an. *R. Wasicky* et al.<sup>1)</sup> haben als erste chemische Untersuchungen an Rinden-Extrakten von *Scutia buxifolia* durchgeführt und dabei neben anderen Inhaltsstoffen vier Alkaloide nachgewiesen.

Wir konnten in der Alkaloid-Fraktion zwölf Komponenten nachweisen, von denen neben Scutianin drei weitere in größerer Menge vorhanden sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß es in die Reihe der in den letzten Jahren aufgeklärten Peptid-Alkaloide Zizyphin<sup>2)</sup>, Ceanothin-B<sup>3)</sup>, Pandaminin<sup>4)</sup> und der Adouetine<sup>5)</sup> einzuordnen ist und ihm die Struktur  $(\text{CH}_3)_2\text{Phe} \rightarrow \text{Pro} \rightarrow 3\text{Hyle} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow \text{NH}-\text{CH}=\text{CH}-$   (1) zukommt<sup>6)</sup>.

### Isolierung und Eigenschaften

Aus einem Methanol-Extrakt der getrockneten Rinde, eingestellt auf pH 9, erhielt man die Rohalkaloide durch Ausschütteln mit Benzol, Überführen in wäßrige Citronensäurelösung und, nach Alkalisieren, erneutes Ausziehen mit Chloroform. Blätter, die ebenso aufgearbeitet worden waren, lieferten das gleiche Alkaloidgemisch.

1) *R. Wasicky, M. Wasicky* und *R. Joachimovits*, *Planta med.* [Stuttgart] **12**, 13 (1964).

2) *E. Zbiral, E. L. Ménard* und *J. M. Müller*, *Helv. chim. Acta* **48**, 404 (1965).

3) *E. W. Warnhoff, J. C. N. Ma* und *P. Reynolds-Warnhoff*, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 4198 (1965).

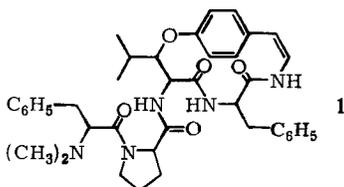
4) *M. Pais, X. Monseur, X. Lusinchi* und *R. Goutarel*, *Bull. Soc. chim. France* **1964**, 817; *M. Pais, F.-X. Jarreau, X. Lusinchi* und *R. Goutarel*, *Ann. Chimie* **1966**, 83.

5) *M. Pais, J. Mainil* und *R. Goutarel*, *Ann. pharmac. franç.* **21**, 139 (1963).

6) Die Bezeichnung der Struktur erfolgte nach den Vorschlägen der *IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature*, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **121**, 1 (1966).

Die Trennung der Rohalkaloide gelang durch zweistufige präparative Schichtchromatographie an Kieselgel. Einer Vortrennung in die vier Hauptgruppen A, B, C und D (Bezeichnung nach abnehmenden  $R_F$ -Werten) mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch folgte die Auftrennung der B-Gruppe mit Essigester/Äther/Chloroform als Fließmittel in fünf Komponenten. Von ihnen stellt  $B_2$  (= Scutianin) den Hauptbestandteil dar.

Durch hochauflösende Massenspektrometrie und Elementaranalyse wurde die Bruttoformel des Scutianins zu  $C_{39}H_{47}N_5O_5$  ermittelt. Es besitzt nur ein basisches Zentrum mit dem  $p_K$ -Wert 5.94, der auf einen zum N-Atom  $\beta$ -ständigen, elektronenanziehenden Substituenten hinweist<sup>7)</sup>. Mit Dragendorffs Reagenz<sup>8)</sup> erhielt man eine rotbraune Färbung, und die Probe auf NH-Gruppierungen nach *Reindl* und *Hoppe*<sup>9)</sup> verlief ebenfalls positiv. Das Vorliegen einer Doppelbindung zeigte sich an der raschen Entfärbung von Kaliumpermanganat. Mit Reagentien auf Ketone oder primäre Amine sowie unter basischen und sauren Acetylierungsbedingungen erfolgte keine Umsetzung. — Scutianin löst sich ausgezeichnet in Chloroform, gut in Methanol und Aceton, mäßig in Tetrachlorkohlenstoff, aber sehr schlecht in Wasser. Die Doppelbindung im Scutianin ließ sich über Platin in Methanol katalytisch hydrieren; man erhielt so ein Dihydroderivat.



### Absorptionsspektren

Das IR-Spektrum zeigt neben den NH-, CH- und Aromaten-Absorptionen ausgeprägte Banden für die *N*-Methyl- (2790/cm) und Carbonylfunktionen (1690 und 1640/cm), eine konjugierte Doppelbindung (1625/cm) und die Phenoläther-Gruppierung (1235/cm). Eine quantitative Auswertung der Carbonyl-Absorptionen nach der *Ramsayschen* Formel<sup>10)</sup> mit *N*-Methyl-pyrrolidon als Standard ergab, daß die Bande bei 1690/cm drei C=O-Gruppen, die bei 1640/cm einer C=O-Gruppe entspricht. Erstere ist daher den gesättigten Amid, letztere der Enamid-Gruppierung<sup>11)</sup> zuzuordnen. Bestätigt wird dies durch das IR-Spektrum des Dihydroscutianins, in dem die Banden bei 1625 und 1640/cm fehlen.

Im NMR-Spektrum des Scutianins findet man das für die beiden Protonen einer *cis*-disubstituierten Doppelbindung charakteristische AB-Spektrum, zentriert bei  $\tau = 3.38$  und  $3.60$  ( $J = 7.5$  Hz), ein Singulett bei  $\tau = 7.93$  für die Dimethylamino-gruppe und ein Paar von Dubletts bei  $\tau = 8.8$  und  $9.2$  ( $J = 7$  Hz; jeweils 3 Protonen). Diese Signale sind auf die Isopropylgruppe zurückzuführen, deren freie Rotation

<sup>7)</sup> A. Weissberger, *Technique of Organic Chemistry*, Bd. XI-1, S. 317 ff., Interscience Publ., New York 1963.

<sup>8)</sup> R. Munier, *Bull. Soc. chim. France* **1952**, 852.

<sup>9)</sup> F. Reindl und W. Hoppe, *Chem. Ber.* **87**, 1103 (1954).

<sup>10)</sup> D. A. Ramsay, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 72 (1952).

<sup>11)</sup> K. Nakanishi, *Infrared Absorption Spectra — Practical*, Holden-Day, San Francisco 1962.

behindert ist<sup>12)</sup>, so daß die beiden Methylgruppen eine unterschiedliche diamagnetische Abschirmung erfahren<sup>13)</sup>. Eine ähnliche konformationsbedingte Aufspaltung beobachtet man im Dihydroscutianin auch für die *N,N*-Dimethyl-Protonen<sup>14)</sup>.

Das UV-Spektrum weist neben der starken Aromaten-Endabsorption nur Schultern bei 252 ( $\log \epsilon = 3.78$ ) und 277  $\mu$  ( $\log \epsilon = 3.22$ ) auf. Während erstere beim Dihydroscutianin fehlt, tritt hier bei 277  $\mu$  ein ausgeprägtes Maximum auf ( $\log \epsilon = 3.31$ ). Dieses ist somit auf die Phenoläther-Gruppierung<sup>15)</sup>, die Schulter bei 252  $\mu$  auf eine Enamid-Absorption<sup>16)</sup> zurückzuführen.

Um diese Zuordnung zu überprüfen, wurde als Modellsubstanz der *N*-Styryl-carbamidsäure-methylester hergestellt<sup>17)</sup>. Er zeigte im UV-Spektrum jedoch keine Enamid-Absorption, dafür aber das für Styryl-Derivate charakteristische Maximum bei 272  $\mu$  ( $\log \epsilon = 4.35$ )<sup>18)</sup>. — Die abweichenden Daten des Scutianins dürften mit dessen Ringstruktur zu erklären sein. Versuche mit Molekülmodellen zeigen nämlich, daß die geringsten sterischen Wechselwirkungen zu erwarten sind, wenn der Benzolring etwa senkrecht zu der durch die übrigen Ringglieder gebildeten Ebene liegt. Dadurch ist die Doppelbindung mit dem Benzolring nicht mehr koplanar und kann nur in Resonanz zur Amidgruppe treten. Im UV-Spektrum beobachtet man daher keine Styryl-, sondern nur die Phenoläther- und Enamid-Absorptionen.

Einen wichtigen Hinweis auf das *p*-Hydroxy-styrylamin-System des Scutianins erbrachte eine Ozonspaltung der Doppelbindung. Der so entstandene, noch mit dem Rest des Moleküls verätherte *p*-Hydroxy-benzaldehyd lieferte ein Absorptionsmaximum bei 275  $\mu$  ( $\log \epsilon = 3.77$ ) mit einer Schulter bei 283  $\mu$ , was mit den für Anisaldehyd gemessenen Werten —  $\lambda_{\max} = 275 \mu$ , Schulter bei 282 und 290  $\mu$  — ausgezeichnet übereinstimmt. Da *m*- und *o*-Methoxy-benzaldehyd bei 253  $\mu$  mit einer intensiven Vorbande bei 309 bzw. 321  $\mu$ <sup>15)</sup> absorbieren, ist damit gleichzeitig die *para*-Stellung der Substituenten gesichert.

### Hydrolysenversuche

Nach der Hydrolyse des Scutianins mit 6*n* HCl im Bombenrohr bei 110° konnten durch Papierchromatographie sechs mit Ninhydrin reagierende Substanzen erkannt werden. Beim chromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen wiesen sie in mehreren Systemen dieselben  $R_F$ -Werte wie *N,N*-Dimethyl-phenylalanin<sup>19)</sup>, Phenylalanin,  $\beta$ -Hydroxy-leucin<sup>20)</sup>, Prolin, Leucin und Glycin auf. Die letzten beiden lagen nach der Intensität der Flecke nur in geringer Menge vor; sie sind offensichtlich unter den Hydrolysenbedingungen aus dem  $\beta$ -Hydroxy-leucin entstanden<sup>20)</sup>. Phenylalanin, Prolin und  $\beta$ -Hydroxy-leucin ließen sich außerdem als

<sup>12)</sup> An Hand von Molekülmodellen läßt sich abschätzen, daß die Isopropylgruppe in **1** durch die Peptidseitenkette in eine nahezu senkrecht zur Molekülebene ausgerichtete und der Seitenkette abgewandten Stellung gezwungen wird.

<sup>13)</sup> Vgl. S. Goodwin, J. N. Shoolery und L. F. Johnson, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3065 (1958).

<sup>14)</sup> Vgl. W. D. Philips, J. chem. Physics **23**, 1363 (1955).

<sup>15)</sup> A. Burawoy und J. T. Chamberlain, J. chem. Soc. [London] **1952**, 2310.

<sup>16)</sup> E. W. Warnhoff, S. K. Pradhan und J. C. N. Ma, Canad. J. Chem. **43**, 2594 (1965).

<sup>17)</sup> R. A. Weermann, Liebigs Ann. Chem. **401**, 1 (1913).

<sup>18)</sup> M. J. Kamlet, Organic Electronic Spectral Data, Bd. IV, S. 218, Interscience Publ., New York 1963.

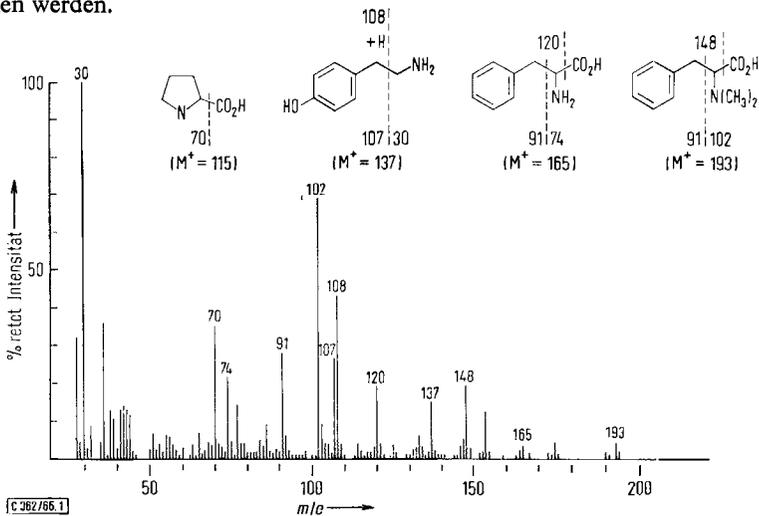
<sup>19)</sup> R. E. Bowman, J. chem. Soc. [London] **1950**, 1342.

<sup>20)</sup> Th. Wieland, H. Cords und E. Keck, Chem. Ber. **87**, 1312 (1954).

Dnp-Derivate dünn-schichtchromatographisch identifizieren; eine photometrische quantitative Bestimmung<sup>21)</sup> ergab hierbei je 0.9 Äquivalente Phenylalanin und Prolin sowie 0.6 Äquivalente  $\beta$ -Hydroxy-leucin. Die *N,N*-Dimethyl-aminosäure konnte ferner durch die typische Gelbfärbung mit Thymolblau<sup>22)</sup>, das Prolin — zur Unterscheidung von Hydroxyprolin — durch die Blaufärbung mit Isatin<sup>23)</sup> und das  $\beta$ -Hydroxy-leucin durch die für vicinale Aminoalkohole zu erwartende Perjodat-Reaktion nachgewiesen werden.

Bei der Synthese des  $\beta$ -Hydroxy-leucins nach *Wieland et al.*<sup>20)</sup> erhält man zu 80—85% die *threo*-Form, die sich von der *erythro*-Form papierchromatographisch gut unterscheiden läßt<sup>24)</sup>. Der Vergleich ergab, daß das aus Scutianin gewonnene  $\beta$ -Hydroxy-leucin ebenfalls der *threo*-Reihe angehört.

*p*-Hydroxy-styrylamin konnte im Hydrolysat des Scutianins nicht aufgefunden werden, offensichtlich wird das Enamin unter den sauren Bedingungen zersetzt. Das durch Hydrolyse des Dihydroscutianins entstehende Tyramin konnte jedoch erfaßt und mit einer authentischen Probe dünn-schicht- und papierchromatographisch verglichen werden.



Abbild. 1. Massenspektrum des Totalhydrolysats des Dihydroscutianins. Aufnahmebedingungen: Massenspektrometer CH 4 (Atlas) mit Festkörper-Ionenquelle TO 4 (Temperatur ca. 70°), Elektronenenergie 70 eV (20  $\mu$ A)

### Massenspektren

Mit Ausnahme des  $\beta$ -Hydroxy-leucins ließen sich die Bestandteile des Dihydroscutianin-Hydrolysats auch massenspektrometrisch nachweisen. Durch vorsichtiges Erhitzen des rohen Hydrolysengemisches in der Ionenquelle wurde über mehrere Stunden ein konstanter Ionenstrom aufrechterhalten und in regelmäßigen Zeitabständen ein Spektrum registriert. Aus den Änderungen der Peak-Intensitäten ließ

21) *K. Heyns und G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **306**, 165 (1957).

22) *I. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. 1, S. 597, G. Fischer, Jena 1963.

23) *l. c.* 22), S. 511.

24) *H. W. Buston und J. Bishop, J. biol. Chemistry* **215**, 217 (1955).

sich ablesen, daß eine grobe Fraktionierung eintrat: Die Substanzen erschienen in der Reihenfolge Prolin, Phenylalanin, *N,N*-Dimethyl-phenylalanin, Tyramin. Abbild. 1 zeigt ein nach etwa 8 Stunden aufgenommenes Spektrum, in dem die charakteristischen Peaks aller vier Komponenten gut zu erkennen sind. Die relativen Intensitäten dieser Peaks stimmen mit den Werten für die reinen, unter gleichen Bedingungen vermessenen Vergleichssubstanzen vollkommen überein.

Die typischen Fragment-Ionen der Verbindungen sind auf die üblichen Spaltungen der zum Stickstoff bzw. zum Benzolring  $\beta$ -ständigen Bindungen<sup>25)</sup> zurückzuführen (vgl. Abbild. 1). Die relativen Peak-Intensitäten betragen für Prolin:  $m/e$  70 = 100%,  $m/e$  115 = 3% (übereinstimmend mit den von *Heyns* und *Grützmacher*<sup>26)</sup> angegebenen Werten); für Phenylalanin:  $m/e$  74 = 100%,  $m/e$  91 = 70%,  $m/e$  120 = 80%,  $m/e$  165 = 9% (abweichend von den publizierten Daten<sup>26)</sup>); für *N,N*-Dimethyl-phenylalanin:  $m/e$  91 = 6%,  $m/e$  102 = 100%,  $m/e$  148 = 23%,  $m/e$  193 = 5%; für Tyramin:  $m/e$  30 = 100%,  $m/e$  107 = 30%,  $m/e$  108 = 60%,  $m/e$  137 = 18%<sup>27)</sup>.

Versuche, das Scutianin enzymatisch mit Chymotrypsin<sup>28)</sup>, Pepsin<sup>28)</sup> oder Subtilisin<sup>29)</sup> abzubauen, waren erfolglos. Mit siedender 6*N* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelang es aber im Dihydroscutianin, die aus Dimethyl-phenylalanin und Prolin bestehende Seitenkette abzuspalten, ohne daß der Ring angegriffen wurde. Die so erhaltene Verbindung **2** reagierte mit Ninhydrin unter Gelbfärbung, wies im IR- und NMR-Spektrum keine *N*-Methyl-Banden mehr auf und ergab bei einer Totalhydrolyse Tyramin, Phenylalanin und  $\beta$ -Hydroxy-leucin.

Die Struktur von **2** konnte durch das Massenspektrum sichergestellt werden (Abbild. 2). Die Elektronenstoß-induzierte Fragmentierung wird durch Spaltungen im  $\beta$ -Hydroxy-leucin-Teil des Moleküls eingeleitet: Eine Homolyse der dem Äther-Sauerstoff bzw. der freien Aminogruppe benachbarten C—C-Bindungen<sup>25)</sup> führt zu den Oxonium- bzw. Imonium-Ionen  $m/e$  352, **a**, **b** und **c**, und die von Aryl-äthyl-äthern bekannte, unter Verschiebung eines Wasserstoffatoms verlaufende Spaltung<sup>30)</sup> ergibt das Ion **d**<sup>31)</sup>. Die so entstandenen offenkettigen Ionen **a**—**d** werden dann

<sup>25)</sup> *H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds, Holden-Day, San Francisco 1964.*

<sup>26)</sup> *K. Heyns und H.-F. Grützmacher, Liebigs Ann. Chem. 667, 194 (1963).*

<sup>27)</sup> Das zum Vergleich vermessene *o*-Hydroxy-phenyläthylamin lieferte:  $m/e$  30 = 100%,  $m/e$  107 = 9%,  $m/e$  108 = 18%,  $m/e$  137 = 28%. Gegenüber dem *para*-Isomeren ist also die Intensität der durch Spaltung der Benzylbindung gebildeten Peaks  $m/e$  107 und 108 auf etwa ein Drittel vermindert.

<sup>28)</sup> *H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 352, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1962.*

<sup>29)</sup> *M. Ottesen und W. A. Schroeder, Acta chem. scand. 15, 926 (1961).*

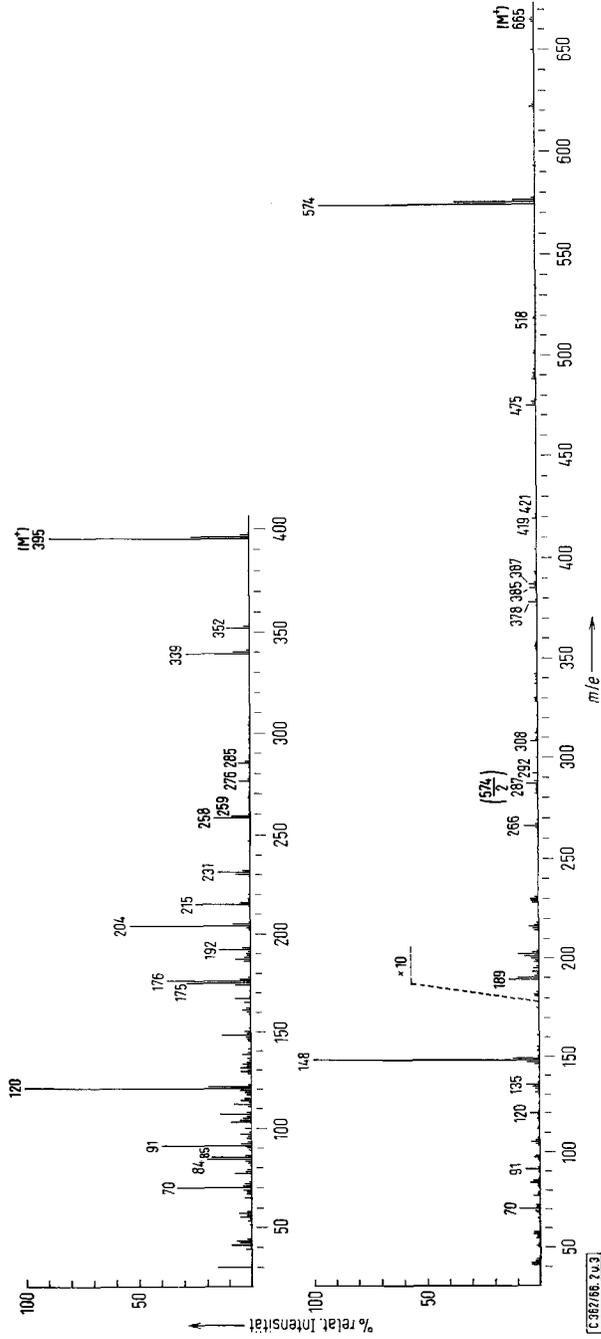
<sup>30)</sup> *F. W. McLafferty, Analytic. Chem. 31, 2072 (1959); Z. Pelah, J. M. Wilson, M. Ohashi, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, Tetrahedron [London] 19, 2233 (1963).*

<sup>31)</sup> *Wie J. K. MacLeod und C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. 88, 1840 (1960), mit Deuterium-markierten Phenyl-*n*-butyl-äthern bewiesen, ist die Herkunft des wandernden H-Atoms unspezifisch. Da jedoch H-Atome aus einer Methylgruppe in wesentlich geringerem Maße verschoben werden als solche von höher substituierten C-Atomen<sup>32)</sup>, sollte sich im vorliegenden Fall eine der beiden möglichen trisubstituierten Doppelbindungen bilden. Zur Erklärung des weiteren Zerfalls erwies es sich als zweckmäßig, im Ion **d** die eine, im Bruchstück-Ion  $m/e$  292 des Scutianins (vgl. Formelschema auf S. 331) die andere Möglichkeit anzunehmen.*

<sup>32)</sup> *H. Fritz, H. Budzikiewicz und C. Djerassi, Chem. Ber. 99, 35 (1966); C. Fenselau und C. Djerassi, Tetrahedron [London] 22, 1391 (1966); C. Djerassi und S. D. Sample, Nature [London] 208, 1314 (1965).*



Abbild. 2. Massenspektrum des Hydrolysenproduktes 2. Aufnahmebedingungen: Massenspektrometer MS 9 (A. E. I.) mit „Direct Insertion Lock“ (Temperatur der Ionenquelle ca. 190°), Elektronenenergie 70 eV (100  $\mu$ A)



Abbild. 3. Massenspektrum des Scutianins (1). Aufnahmebedingungen wie zu Abbild. 2 (oben) angegeben

stufenweise durch Spaltungen an den Amidgruppen abgebaut, ähnlich den für einfache, lineare Peptide geltenden Regeln<sup>33)</sup>. Die im Formelschema S. 328 zusammengestellten Zerfallswege<sup>34)</sup> konnten, soweit angegeben, durch metastabile Ionen gestützt werden. Für sämtliche Bruchstück-Ionen wurde außerdem durch hochauflösende Massenspektrometrie die Summenformel bestimmt (s. Tabelle); die dabei ermittelten Intensitätsverhältnisse in den Massendoublets  $m/e$  120 und 175 sind bei den entsprechenden Fragmenten im Formelschema ebenfalls angeführt.

Auf Grund dieser übersichtlichen Abbaureaktionen ist die Verknüpfung des  $\beta$ -Hydroxy-leucins, des Phenylalanins und des Tyramins zu dem 14-gliedrigen Ring-system **2** bewiesen. Die im Scutianin zusätzlich vorhandenen Aminosäuren *N,N*-Dimethyl-phenylalanin und Prolin müssen demnach als Seitenkette an der Aminogruppe des  $\beta$ -Hydroxy-leucins haften. Bestätigt wurde dies durch das Massenspektrum des Scutianins; es erlaubte ferner die Lokalisierung der Doppelbindung, die mit Hilfe der Absorptionsspektren nicht eindeutig zuzuordnen war.

Hervorstechendes Merkmal des Spektrums sind die intensiven Peaks bei den Massenzahlen 148 und 574 (Abbild. 3, S. 329), die durch  $\alpha$ -Spaltung der tertiären Ami-

Summenformeln der Fragment-Ionen des Scutianins (**1**) und des Hydrolysenproduktes **2**. Sie wurden mit dem A. E. I.-Massenspektrometer MS 9 bei einem Auflösungsvermögen von  $(M/\Delta M)_{10\%} = 15000$  und  $(C_4F_9)_3N$  als Referenz-Substanz ermittelt

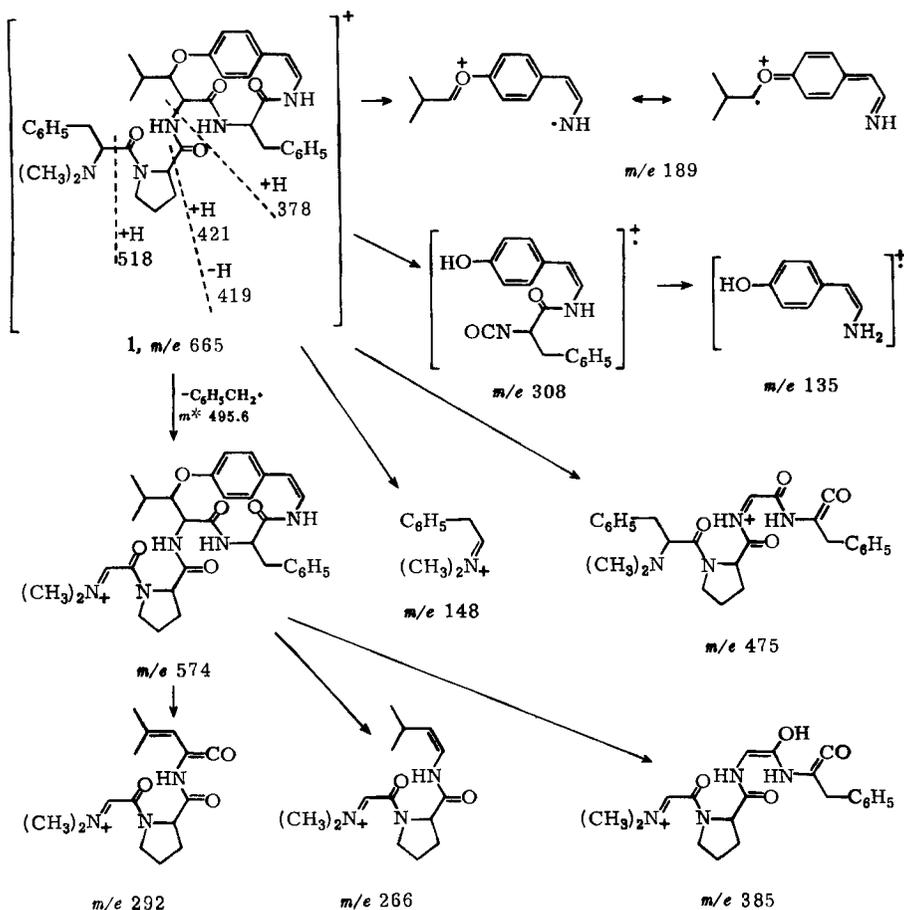
Scutianin ( <b>1</b> ; Abbild. 3)			Hydrolysenprodukt <b>2</b> (Abbild. 2)		
Meßwert	Summenformel	Abweichung in $mu^*)$	Meßwert	Summenformel	Abweichung in $mu^*)$
665.3552	$C_{39}H_{47}N_5O_5$	-2.5	395.2217	$C_{23}H_{29}N_3O_3$	+0.8
574.3030	$C_{32}H_{40}N_5O_5$	+0.1	352.1662	$C_{20}H_{22}N_3O_3$	+0.1
518.2515	$C_{29}H_{34}N_4O_5$	-1.4	339.2072	$C_{21}H_{27}N_2O_2$	-
475.2346	$C_{27}H_{31}N_4O_4$	+0.1	285.1599	$C_{17}H_{21}N_2O_2$	-0.4
421.1998	$C_{24}H_{27}N_3O_4$	-0.3	276.1711	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	-0.1
419.1837	$C_{24}H_{25}N_3O_4$	-0.8	259.1434	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	-1.2
387.2022	$C_{20}H_{27}N_4O_4$	-1.0	258.1369	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	+0.1
385.1870	$C_{20}H_{25}N_4O_4$	-0.6	231.1500	$C_{14}H_{19}N_2O$	+0.3
378.1941	$C_{23}H_{26}N_2O_3$	-0.2	215.0821	$C_{12}H_{11}N_2O_2$	+0.1
308.1146	$C_{18}H_{16}N_2O_3$	-1.5	204.0920	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	+2.1
292.1667	$C_{15}H_{22}N_3O_3$	+0.6	192.1392	$C_{12}H_{18}NO$	+0.4
266.1869	$C_{14}H_{24}N_3O_2$	+0.1	176.0950	$C_{10}H_{12}N_2O$	-
189.1147	$C_{12}H_{15}NO$	-0.7	175.0871	$C_{10}H_{11}N_2O$	-
148.1136	$C_{10}H_{14}N$	+1.0	175.1123	$C_{12}H_{15}O$	-
135.0682	$C_8H_9NO$	-0.2	120.0576	$C_8H_8O$	+0.1
120.0813	$C_8H_{10}N$	-	120.0815	$C_8H_{10}N$	+0.2
			91.0554	$C_7H_7$	+0.6
			85.0890	$C_5H_{11}N$	-0.1
			84.0812	$C_5H_{10}N$	-0.1
			70.0656	$C_4H_8N$	-0.1

$mu^*) = 10^{-3}$  Masseneinheiten, bezogen auf  $^{12}C = 12.0000$ .

<sup>33)</sup> K. Heyns und H.-F. Grützmaier, Tetrahedron Letters [London] 1963, 1761, und Liebigs Ann. Chem. 669, 189 (1963); F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. K. Sun, Z. Naturforsch. 20b, 1169 (1965).

<sup>34)</sup> Die Verschiebung einzelner Elektronen ( $\cdot$ ) bzw. eines Elektronenpaares ( $\cdot\cdot$ ) ist entsprechend einem Vorschlag in l. c. 25), S. XII, symbolisiert.

nogruppe entstehen (vgl. Formelschema). In diesen Fragment-Ionen ist die positive Ladung so ausgezeichnet stabilisiert<sup>25,35</sup>, daß alle anderen Peaks nur in untergeordneter Intensität erscheinen. Die stufenweise Abspaltung der Seitenkette erfolgt wie in 1 angedeutet. Durch ähnliche Reaktionsabläufe, wie sie bei 2 diskutiert wurden, zerfallen das Molekular-Ion bzw. das Bruchstück *m/e* 574 zu den übrigen im Formelschema aufgeführten und durch die Bestimmung der Summenformeln (Tab.) bestätigten Fragmenten. Von ihnen sind vor allem die — relativ hohe Peaks liefernden — Ionen *m/e* 189 und 135 von Bedeutung, da sie das Vorliegen einer *p*-Hydroxy-styrylamin-Gruppierung beweisen. Außerdem zeigt das Massenspektrum noch Peaks bei *m/e* 70 und 120, die den charakteristischen „Aminfragmenten“ des Prolins bzw. Phenylalanins zuzuordnen sind<sup>33</sup>) (vgl. auch Abbild. 1), sowie bei *m/e* 91, ein aus den beiden aromatischen Aminosäuren gebildetes Benzylum-Ion.



<sup>35</sup>) W. Vetter, P. Longevialle, F. Khuong-Huu-Laine, Qui Khuong-Huu und R. Goutarel, Bull. Soc. chim. France 1963, 1324; L. Dolejš, V. Hanuš, V. Černý und F. Šorm, Coll. czechoslov. chem. Commun. 28, 1584 (1963).

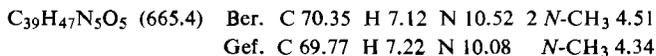
Herrn Prof. Dr. R. Wasicky, Sao Paulo, danken wir sehr für die Beschaffung der Rinde von *Scutia buxifolia* Reiss., Herrn Dr. G. Legler für mannigfache Anregungen und der *Stiftung Volkswagenwerk* für die zur Anschaffung der beiden Massenspektrometer zur Verfügung gestellten Mittel.

### Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die Elementaranalysen wurden von Dr. F. Pascher, Bonn, oder im Mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts ausgeführt. Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer-Gerät, Modell 221 (mit Gitter-Prismen-Austauscheinheit), die UV-Spektren am Cary-14-Spektrophotometer vermessen. Zur Dünnschichtchromatographie diente Kieselgel G bzw. HF<sub>254</sub>, Merck, zur Papierchromatographie das Papier Schleicher u. Schüll Nr. 2043 bMg I.

**Isolierung des Scutianins (1):** 8 kg getrocknete Rinde von *Scutia buxifolia* Reiss. wurden mit einem Ultra-Turrax fein zerkleinert und mehrmals mit Methanol ausgezogen. Der Extrakt wurde auf ein kleines Volumen eingeeengt, mit der gleichen Menge Wasser versetzt, mit konz. Ammoniak auf pH 9 gebracht und sechsmal mit je 500 ccm Benzol ausgeschüttelt. Die Benzolphase wurde mit 5-proz. wäßr. Citronensäure extrahiert, diese dann ammoniakalisch gemacht und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Chloroforms erhielt man 14.4 g Rohalkaloide.

Zur Vortrennung in die 4 Gruppen A, B, C und D wurden je 250 mg auf Kieselgel-HF-Schichten (50 g auf Platten 20 × 40 cm) mit Chloroform/Methanol (95:5) chromatographiert. Die  $R_F$ -Werte betragen nach doppelter Entwicklung: 0.72 (A), 0.62 (B), 0.44 (C) und 0.36 (D). Je 150 mg der B-Gruppe wurden dann analog durch Zweifachentwicklung mit Essigester/Äther/Chloroform (10:10:1) aufgetrennt.  $R_F$ -Werte: 0.72 (B<sub>1</sub>), 0.60 (B<sub>2</sub>), 0.51 (B<sub>3</sub>), 0.40 (B<sub>4</sub>) und 0.12 (B<sub>5</sub>). Durch Elution von B<sub>2</sub> mit Methanol erhielt man 4.49 g *Scutianin* (1). Aus Äthanol/Wasser und Chloroform/Petroläther lieferte es farblose Nadeln vom Schmp. 186 bis 187°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-399^\circ$  ( $c = 0.15$ , Chloroform).



UV (in Methanol): Schultern bei 252 ( $\log \epsilon = 3.78$ ) und 277  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 3.22$ ).

IR (in Chloroform): 3390, 2790, 1690, 1640, 1625, 1500, 1235, 865 und 690/cm.

**Hydrierung von 1 zu Dihydroscutianin:** 150 mg 1 wurden in 25 ccm Methanol p. a. mittels 0.5 g Platinoxid bei Normaldruck hydriert. Es wurden 5.17 ccm  $H_2$  (1 Äquiv.) aufgenommen. Anschließend wurde vom Katalysator abfiltriert, das Methanol abgedampft und der Rückstand (149 mg) aus Methanol/Benzol umkristallisiert: Farblose Nadeln vom Schmp. 239 bis 240°;  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-158^\circ$  ( $c = 0.1$ , Chloroform).

UV (in Methanol):  $\lambda_{\max}$  277  $m\mu$  ( $\log \epsilon = 3.31$ ).

IR (in Chloroform): 3390, 2790, 1660, 1500, 1235, 860 und 690/cm.



**Ozonspaltung von 1:** 300 mg 1 wurden in 20 ccm Methanol p.a. gelöst und bei  $-70^\circ$  15 Min. Ozon (250 mg) eingeleitet. Dann wurde mit verd. Ameisensäure versetzt, auf  $70^\circ$  erwärmt und darauf das Methanol i. Vak. verjagt. Die verbleibende Lösung wurde mit Wasser verdünnt, alkalisch gemacht und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Chloroforms

verblieben 245 mg Rückstand, aus dem durch mehrfache Dünnschichtchromatographie (Kieselgel HF, Aceton/Methanol 35:15 und Chloroform/Methanol 90:10) 30.4 mg eines Aldehyds isoliert werden konnten.

UV (in Methanol):  $\lambda_{\max} = 275 \text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 3.77$ ).

IR (in Chloroform): 3470, 3400, 3330, 1690, 1675, 1600, 1500, 1270, 1240, 820, 690/cm.

NMR: Aldehyd-Proton bei  $\tau = 1.08$ .

2,4-Dinitro-phenylhydrazon: Schmp. 105°;  $\lambda_{\max} = 383 \text{ m}\mu$  (Methanol).

*Hydrolyse von 1*: 20 mg **1** wurden mit 1 ccm 6*n* HCl in einem starkwandigen Glasrohr eingeschmolzen und 24 Stdn. auf 110° erhitzt. Das Reaktionsgemisch brachte man im Exsikkator über KOH zur Trockne, nahm den Rückstand in 1 ccm Wasser auf und chromatographierte auf Papier zusammen mit authent. Verbindungen. Die in den verschiedenen Systemen beobachteten  $R_F$ -Werte sind:

System	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Phe	Leu	Phe	3Hyle	Pro	Gly
n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5; leichte Phase) <sup>36)</sup>	0.63	0.60	0.54	0.39	0.28	0.18
n-Butanol/Aceton/Wasser/Dicyclohexylamin (10:10:5:2) <sup>37)</sup>	0.75	—	0.69	0.84	0.35	0.37
n-Butanol/Eisessig/Wasser (9:1:1) <sup>36)</sup>	0.53	0.40	0.35	0.26	0.16	0.07
n-Butanol/Aceton/Wasser/Propionsäure (10:10:5:2) <sup>37)</sup>	0.70	0.61	0.55	0.47	0.37	0.19

Zur Unterscheidung zwischen *threo*- und *erythro*- $\beta$ -Hydroxy-leucin wurde in n-Butanol, mit 10-proz. wäfr. Diäthylaminlösung gesättigt, chromatographiert.  $R_F$ -Werte: *threo*-Hyle 0.66, *erythro*-Hyle 0.52, Hydrolysat 0.65.

*Hydrolyse des Dihydroscutianins*: 17 mg Dihydroscutianin wurden mit 1.5 ccm 6*n* HCl im Bombenrohr 24 Stdn. auf 110° erhitzt. Nach Eintrocknen des Hydrolysats über KOH wurde der Rückstand in 1 ccm Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen. Dünnschichtchromatogramme in den Systemen Chloroform/Methanol (7:3) und n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)<sup>38)</sup> ergaben dieselben  $R_F$ -Werte wie Tyramin: 0.33 bzw. 0.53.

*Quantitative Bestimmung der Aminosäuren*: Hierzu wurde das Hydrolysat des Dihydroscutianins mit 15 ccm Wasser aufgenommen und nach Zusatz von 1 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 ccm Dinitrofluorbenzol und 30 ccm Äthanol 5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Der Alkohol wurde abgedampft und die verbleibende wäfr. Lösung mehrmals mit Äther extrahiert. Dann säuerte man mit HCl auf pH 2 an und schüttelte erneut mit Äther aus. Diese Ätherphase wurde zur Trockne gebracht und der Rückstand in 10 ccm Isopropylalkohol gelöst. Die Chromatographie auf Kieselgel G im System Cyclohexan/Eisessig/Essigester/Methanol (45:2:45:10) ergab 4 gelbe Hauptflecke, die durch Vergleich mit Dnp-Phe, Dnp-Pro und Dnp-3Hyle identifiziert wurden; der 4. Fleck stammte von 2,4-Dinitro-phenol.  $R_F$ -Werte: Dn-Phenol 0.69, Dnp-Phe 0.62, Dnp-Pro 0.54, Dnp-Hyle 0.47. Zur quantitativen Bestimmung wurden 0.1 ccm der Isopropylalkohollösung chromatographiert, die einzelnen Flecke mit je 10 ccm kalt gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung eluiert und der Gehalt an Dnp-Derivaten gegen Hydrogencarbonatlösung photometrisch bestimmt:

<sup>36)</sup> I. c. 22, S. 525.

<sup>37)</sup> G. W. Kenner und R. C. Sheppard, Nature [London] **181**, 48 (1958).

<sup>38)</sup> H. K. Berry, H. E. Sutton, L. Cain und J. S. Berry, Univ. Texas Publ. **5109**, 22 (1951).

Dnp-Phe [360 m $\mu$  ( $\epsilon = 16\,800$ )]:

Gef. 3.8 mg Phe/17 mg Dihydroscutianin (= 0.9 Äquivv.)

Dnp-Pro [383 m $\mu$  ( $\epsilon = 15\,700$ )]:

Gef. 2.6 mg Pro/17 mg Dihydroscutianin (= 0.88 Äquivv.)

Dnp-Hyle [360 m $\mu$  ( $\epsilon = 15\,700$ )]:

Gef. 2.2 mg Hyle/17 mg Dihydroscutianin (= 0.60 Äquivv.)

*Partialhydrolyse des Dihydroscutianins:* 292 mg *Dihydroscutianin* wurden mit 60 ccm 6*n*  $H_2SO_4$  24 Std. unter Rückfluß erhitzt. Danach wurde mit NaOH auf pH 9 gebracht und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Chloroforms verblieben 157.7 mg Rückstand, der laut Chromatogramm (Chloroform/Methanol 94:6 auf Kieselgel HF) aus 3 Komponenten bestand. Die unpolarste Substanz ( $R_F = 0.58$ ) reagierte mit Dragendorffs Reagenz positiv und mit Ninhydrin unter Gelbfärbung. Sie wurde eluiert und lieferte aus Benzol 22 mg **2** als farblose Nadeln vom Schmp. 246–247°.

$C_{23}H_{29}N_3O_3$  Mol.-Gew. Ber. 395.2218 Gef. 395.2209 (hochauflösende Massenspektrometrie).

IR (in Chloroform): 3420, 3410, 1660, 1500, 1235 und 690/cm.

Die Totalhydrolyse von **2** lieferte *Tyramin*, *Phenylalanin* und  $\beta$ -*Hydroxy-leucin*.

[362/66]

---