

Rudolf Tschesche, Jörg Rheingans, Hans-Wolfram Fehlhaber und Günter Legler

Alkaloide aus Rhamnaceen, II¹⁾

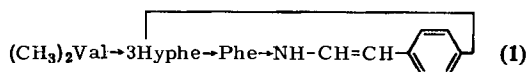
Integerressin und Integerrenin, zwei Peptid-Alkaloide aus *Ceanothus integerrimus* Hook. et Arn.²⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

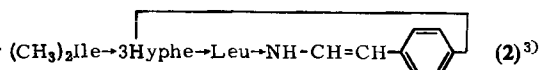
(Eingegangen am 23. Juni 1967)

Aus den Wurzeln der nordamerikanischen Rhamnaceae *Ceanothus integerrimus* Hook. et Arn. wurden die Alkaloide Integerressin und Integerrenin isoliert. Sie gehören in die Reihe der durch eine Verätherung cyclisierten Peptid-Alkaloide. In beiden Verbindungen ließen sich eine *p*-Hydroxy-styrylamin- und eine β -Hydroxy-phenylalanin-Gruppierung nachweisen; Integerressin enthält außerdem Phenylalanin und *N,N*-Dimethyl-valin, Integerrenin Leucin und *N,N*-Dimethyl-isoleucin. Eine detaillierte Analyse der Massenspektren ergab für das

Integerressin die Struktur



und für das Integerrenin die Struktur



Der massenspektrometrische Zerfall von 1 und 2 diente als Grundlage zur Aufstellung eines für Alkaloide dieses Typs charakteristischen Fragmentierungsschemas.

Bestimmte Vertreter aus der Pflanzenfamilie der Rhamnaceae haben in der Volksmedizin in Asien⁴⁾ sowie in Nord-⁵⁾ und Südamerika⁶⁾ ein breites therapeutisches Anwendungsgebiet gefunden. Bei der vor wenigen Jahren aufgenommenen chemischen Untersuchung stieß man auf eine neue Klasse von Naturstoffen, die Peptid-Alkaloide^{1,4,5,7,8)}, die gleichzeitig auch aus Pflanzen verwandter Familien isoliert wurden^{9–12)}. Von den bisher bekannt gewordenen vierzehn Peptid-Alkaloiden konnten

1) I. Mitteil.: R. Tschesche, R. Welters und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. 100, 323 (1967).

2) Auszug aus der Dissertat. J. Rheingans, Univ. Bonn 1967.

3) Die hier benutzte Nomenklatur entspricht den Vorschlägen der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 121, 1 (1966).

4) E. L. Ménard, J. M. Müller, A. F. Thomas, S. S. Bhatnagar und N. J. Dastoor, Helv. chim. Acta 46, 1801 (1963).

5) E. W. Warnhoff, S. K. Pradhan und J. C. N. Ma, Canad. J. Chem. 43, 2594 (1965).

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

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

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

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

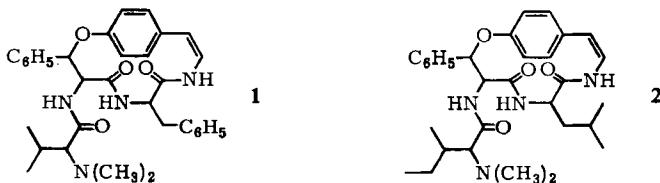
10) M. Pais, X. Monseur, X. Lusinchi und R. Goutarel, Bull. Soc. chim. France 1964, 817.

11) M. Pais, F.-X. Jarreau, X. Lusinchi und R. Goutarel, Ann. Chimie 1966, 83.

12) M. Pais, J. Marchand, X. Monseur, F.-X. Jarreau und R. Goutarel, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 264, 1409 (1967).

fünf in ihrer Struktur aufgeklärt werden, nämlich Zizyphin⁷⁾, Pandamin^{10,11)}, Pandaminin¹¹⁾, Hymenocardin¹²⁾ und Scutianin¹⁾.

In einem Extrakt aus *Ceanothus integerrimus* Hook. et Arn., einem in Nordamerika beheimateten Strauch aus der Familie der Rhamnaceae, haben wir vier Alkaloide nachweisen können, von denen zwei allerdings nur in äußerst geringer Menge vorkommen. Die beiden Hauptalkaloide, Integerressin und Integerrenin, stellen zwei neue Peptid-Alkaloide dar. Wie die im folgenden geschilderten Untersuchungen zeigen, besitzen sie die Strukturformeln **1** (Integerressin) und **2** (Integerrenin), weisen also das gleiche Ringsystem wie Scutianin¹⁾ auf.



Isolierung und Eigenschaften

Wurzeln von *Ceanothus integerrimus* wurden mit einem Äthylchlorid/Methanol-Gemisch extrahiert. Aus diesem Extrakt ließen sich die basischen Inhaltsstoffe durch Versetzen mit Ammoniak und Ausschütteln mit Benzol, anschließendes Überführen in wäßrige Citronensäurelösung und, nach Alkalisieren, erneutes Ausziehen mit Chloroform gewinnen¹⁾. Die weitere Reinigung und Auftrennung der Rohalkaloide erfolgte durch Chromatographie an Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe IV; die dabei anfallenden Mischfraktionen konnten an Kieselgel fast vollständig aufgetrennt werden. Die Ausbeuten der auf diese Weise erhaltenen reinen Hauptalkaloide betragen etwa 0.03% Integerressin und 0.008% Integerrenin, bezogen auf das eingesetzte Pflanzenmaterial.

Durch Elementaranalyse und hochauflösende Massenspektrometrie wurde die Summenformel des Integerressins zu $C_{33}H_{38}N_4O_4$ und die des Integerrenins zu $C_{31}H_{42}N_4O_4$ ermittelt. Beide Alkaloide ergaben mit Dragendorffs Reagenz¹³⁾ eine rotbraune, mit 30proz. Schwefelsäure eine dunkelbraune Färbung⁴⁾. Rasche Entfärbung alkalischer Kaliumpermanganatlösung ließ auf das Vorliegen einer C=C-Doppelbindung schließen. Dementsprechend ließen sich beide Verbindungen durch katalytische Hydrierung in Dihydroderivate überführen. — Integerressin und Integerrenin sind in den üblichen organischen Lösungsmitteln nur mäßig löslich, in Aceton, Essigester, Benzol und Tetrachlorkohlenstoff sind sie sehr schlecht und in Wasser nicht löslich.

Die Absorptionsspektren der beiden Alkaloide sind weitgehend analog. In den mit KBr-Preßlingen aufgenommenen IR-Spektren erkennt man neben den CH- und Aromaten-Schwingungen charakteristische Banden für die NH- (um 3285/cm), N-Methyl- (bei etwa 2790/cm) und Carbonylgruppen (um 1680 und 1630/cm) sowie eine Phenoläther-Absorption (etwa 1230/cm).

13) R. Munier, Bull. Soc. chim. France 1952, 852.

Die in Trifluoressigsäure-Lösung aufgenommenen NMR-Spektren weisen bei beiden Alkaloiden und auch bei ihren Dihydroderivaten eine ungewöhnliche Anomalie auf: Für die Dimethylaminogruppe erscheinen jeweils zwei weit auseinanderliegende, durch die Protonisierung des Stickstoffs mit etwa 4.5 Hz aufgespaltene Dubletts¹⁴⁾, und zwar eines bei dem unter diesen Bedingungen zu erwartenden Wert von $\tau = 7.1$ bis 7.25,^{10, 12, 14)} das andere bei $\tau = 7.8$ bis 7.9. Diese starke diamagnetische Verschiebung ist, wie sich an Hand von Molekül-Modellen zeigen läßt, darauf zurückzuführen, daß die Dimethylaminogruppe sehr nahe über dem Benzolring des β -Hydroxy-phenylalanins liegt, wodurch eine der Methylgruppen in den Einfluß des Benzol-Ringstroms geraten kann. Bei Verwendung von Deuteriochloroform als Lösungsmittel — was allerdings aus Gründen der Löslichkeit nur beim Integerrenin (2) möglich war — fallen die beiden Signale zu einem Singulett bei $\tau = 8.16$ zusammen. Offenbar besitzt die Seitenkette hier eine veränderte Konformation, denn anstelle einer *N*-Methylgruppe gelangt nun die β -ständige *C*-Methylgruppe des *N,N*-Dimethylisoleucin-Restes in den Bereich des Benzol-Ringstroms: Man findet das für sie zu erwartende Dublett bei $\tau = 9.68$ ($J = 6.5$ Hz). Die endständige Methylgruppe in 2 liefert — in Deuteriochloroform — ein Triplet bei $\tau = 9.22$ ($J = 6.5$ Hz), das teilweise verdeckt wird von einem Dublett bei $\tau = 9.20$ ($J = 7$ Hz) für die Methylprotonen des in das Ringsystem eingebauten Leucins. In Trifluoressigsäure erscheinen alle vier *C*-Methylgruppen als nicht aufgelöster Signalkomplex um $\tau = 9.07$; in diesem Lösungsmittel lassen sich auch die vier Protonen für die Methylengruppen im Integerrenin (2) identifizieren, sie ergeben ein verhältnismäßig schmales Multiplet bei $\tau = 8.55$. — Die beiden *C*-Methylgruppen im Integerressin (1) sind als Dublett bei $\tau = 9.05$ ($J = 7$ Hz, in Trifluoressigsäure) zu erkennen.

Die UV-Spektren der Dihydroderivate beider Alkaloide weisen die für *p*-Alkylphenoläther typischen Absorptionsmaxima um 227 und 277 μ ($\log \epsilon = 4.1$ bzw. 3.1) auf¹⁵⁾. Beide Banden sind optisch aktiv, denn man findet jeweils bei etwa 239 μ einen schwach negativen, bei 280 μ einen schwach positiven Circular dichroismus. Die Alkaloide selbst zeigen im UV-Spektrum auf einer hohen Aromaten-, „Endabsorption“ lediglich Schultern bei 252 und 280 μ , von denen die letztere der langwelligen Phenolätherbande entspricht. Die (schwache) Absorption bei 252 μ ist, da sie bei den Dihydroderivaten fehlt, offensichtlich auf die C=C-Doppelbindung zurückzuführen, jedoch läßt sich nicht entscheiden, ob sie durch deren Konjugation mit dem Benzolring oder mit der benachbarten Amid-Gruppierung zustande kommt; sowohl *p*-Alkoxy-styrole¹⁶⁾ als auch Enamide¹⁸⁾ können nämlich in diesem Bereich

¹⁴⁾ J. C. N. Ma und E. W. Warnhoff, Canad. J. Chem. 43, 1849 (1965).

¹⁵⁾ M. J. Kamlet (Herausg.), Organic Electronic Spectral Data, Bd. I, S. 210, Interscience Publ., New York 1966.

¹⁶⁾ *p*-Methoxy-styrol liefert ein hohes Absorptionsmaximum bei 259 μ ($\log \epsilon = 4.3$)¹⁷⁾. Bei 1 und 2 würde die Styrol-Absorption aber stark erniedrigt sein, da der Benzolring aus sterischen Gründen fast senkrecht zur Ebene des 14-gliedrigen Ringsystems liegen muß¹⁾. Mit Hilfe von Stuart-Briegleb-Molekülmodellen läßt sich abschätzen, daß die C=C-Doppelbindung und der Benzolring etwa 70° gegeneinander verdrillt sind. Nach der Beziehung $\epsilon \sim \cos^2 \tau$ dürfte die Styryl-Absorption daher nur noch etwa 10% vom üblichen Wert betragen, was mit der schwachen, nur als Schulter bei 252 μ zu erkennenden Absorption im Einklang stünde.

¹⁷⁾ O. H. Wheeler und L. A. Kaplan (Herausg.), Organic Electronic Spectral Data, Bd. III, S. 201, Interscience Publ., New York 1956.

absorbieren. Beide Alkaloide weisen bei 238 bis 239 $m\mu$ einen stark negativen Circular-dichroismus auf ($\Delta\epsilon_{\max} = -19.0$ bei **1** und -21.5 bei **2**), der wahrscheinlich mit der UV-Absorption bei 252 $m\mu$ in Zusammenhang steht. Auch hier läßt sich eine eindeutige Zuordnung nicht treffen, da sowohl nicht-koplanare Styryl-Systeme¹⁹⁾ als auch Enamide²⁰⁾ solche ausgeprägten Cotton-Effekte verursachen.

Hydrolysen

Zum qualitativen Nachweis der Aminosäuren wurde mit 6*n* HCl im Bombenrohr bei 120° hydrolysiert und das Reaktionsgemisch papierchromatographisch in mehreren Fließmittelsystemen mit authentischen Verbindungen verglichen. Die dazu benötigten *N,N*-Dimethyl-aminosäuren wurden durch Methylierung mit Formaldehyd und katalytisch erregtem Wasserstoff²¹⁾ hergestellt. Im Integerressin (**1**) konnten auf diese Weise Phenylalanin und *N,N*-Dimethyl-valin, im Integerrenin (**2**) Leucin und *N,N*-Dimethyl-isoleucin identifiziert werden. Neben diesen Aminosäuren fand sich im Hydrolysat der beiden Dihydroderivate jeweils noch Tyramin. Daraus darf man schließen, daß in den Alkaloiden selbst ursprünglich eine *p*-Hydroxy-styrylamin-Einheit vorgelegen hatte, die nach einer sauren Hydrolyse nicht zu fassen ist¹⁾.

Alle Reaktionsansätze enthielten schließlich noch eine sehr unpolare, in Wasser unlösliche Substanz. Da sie im Massenspektrum — aufgenommen vom Totalhydrolysat des Dihydrointegerressins — außer einem intensiven Molekülpeak bei *m/e* 204 keinerlei bedeutende Fragmentpeaks aufwies, mußte es sich um eine aromatische Verbindung, vermutlich einen Kohlenwasserstoff der Zusammensetzung $C_{16}H_{12}$, handeln. Es ist bekannt, daß β -Hydroxy-aminosäuren in saurem Medium leicht dehydratisieren und dann hydrolytisch in die α -Keto-carbonsäuren umgewandelt werden, die sekundär in verschiedene Produkte übergehen können. Beim β -Hydroxy-phenylalanin (= Phenylserin) tritt dabei Decarboxylierung zum Phenylacetaldehyd und eine anschließende Kondensation zum β -Phenyl-naphthalin ein²²⁾. Eine Probe hiervon, unter den für die Alkaloide angewandten Hydrolysenbedingungen aus reinem β -Hydroxy-phenylalanin gewonnen, erwies sich als identisch mit dem obigen Kohlenwasserstoff (Dünnschichtchromatogramm und — nach der unten beschriebenen präparativen Isolierung — IR-Spektren und Mischprobe). — In einem Fall, beim Dihydrointegerressin, konnte nach Verwendung von 3*n* HCl zur Hydrolyse papierchromatographisch auch eine Spur unverändertes β -Hydroxy-phenylalanin erkannt werden.

Um die Konfiguration der Aminosäuren zu bestimmen, wurden die von den beiden Dihydroderivaten erhaltenen Hydrolysenprodukte in präparativem Maßstab aufgetrennt. Dazu wurde das β -Phenyl-naphthalin mit Benzol herausgewaschen, das verbliebene Gemisch an einem stark sauren Ionenaustauscher (Dowex 50) von

¹⁸⁾ Einige von Warnhoff et al.⁵⁾ angeführten Enamide, die wegen einer zusätzlichen Substitution der C=C-Doppelbindung allerdings als Modelle nur bedingt geeignet sind, absorbieren bei 250—255 $m\mu$.

¹⁹⁾ P. Crabbé, Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry, S. 253, Holden-Day, San Francisco 1965.

²⁰⁾ A. Yogev und Y. Mazur, Tetrahedron [London] **22**, 1317 (1966); J. P. Kutney, G. Eigendorf und J. E. May, Chem. Communications [London] **1966**, 59.

²¹⁾ R. E. Bowman, J. chem. Soc. [London] **1950**, 1342.

²²⁾ F. Bettziche, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **150**, 177 (1925).

Verunreinigungen befreit und das Tyramin an einem schwach sauren Ionenaustauscher (Amberlite IRC 50) abgetrennt. Die Isolierung des Phenylalanins und des *N,N*-Dimethyl-valins (aus dem Dihydrointegerressin) erfolgte durch Chromatographie an einer Kohlesäule¹¹⁾, die des Leucins und *N,N*-Dimethyl-iso-leucins (aus dem Dihydrointegerrenin) durch fraktionierte Vakuumsublimation. Die Messung des optischen Drehungsvermögens zeigte, daß alle vier Aminosäuren der L-Reihe angehören. Damit ist die Konfiguration jeweils zweier asymmetrischer C-Atome in den Formeln des Integerressins (1) und des Integerrenins (2) festgelegt, eine Zuordnung für den β -Hydroxy-phenylalanin-Teil war in beiden Fällen allerdings nicht möglich.

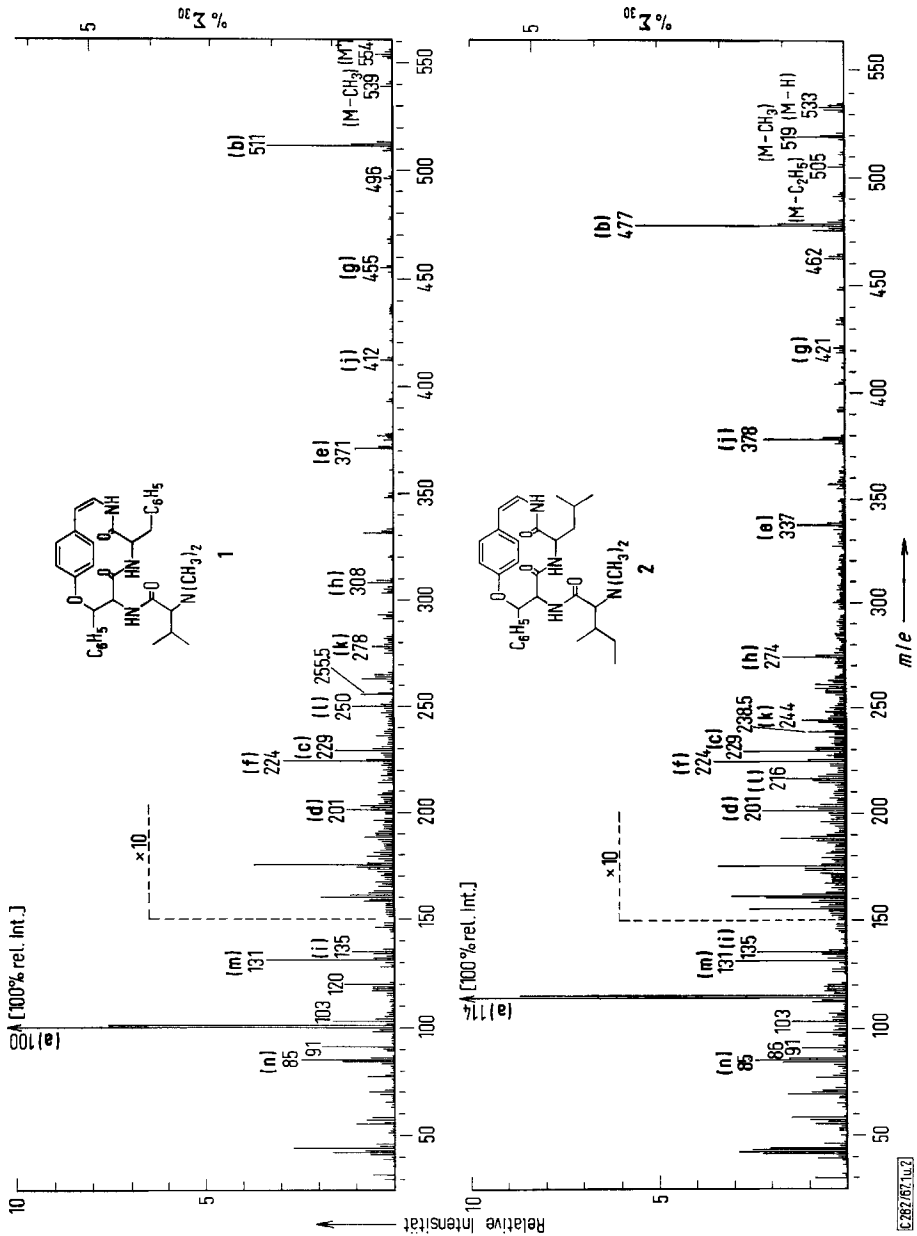
Massenspektren

Die Massenspektren aller Peptid-Alkaloide des hier vorliegenden Typs sind durch einen äußerst intensiven *base peak* gekennzeichnet, der durch das „Aminfragment“ der endständigen *N,N*-Dimethyl-aminosäure gebildet wird^{1,5,11)}. Beim Integerressin macht dieser Peak (*m/e* 100 in Abbild. 1) einen Anteil von 62,2%, beim Integerrenin (*m/e* 114 in Abbild. 2) von 59,8% an der gesamten Ionenausbeute aus! Daneben findet man im unteren Massenbereich eine Reihe von Peaks, die unschwer als typische Bruchstücke der übrigen Aminosäuren und der *p*-Alkoxy-styrylamid-Einheit zu identifizieren sind^{1,8)}. Fragment-Ionen, die Kombinationen von zwei oder drei „Untereinheiten“ des Moleküls (oder Teile davon) enthalten und die daher Aufschluß über deren Verknüpfung liefern, treten meist nur in sehr geringer Intensität auf (vgl. Abbild. 1 und 2, in denen alle Peaks oberhalb *m/e* 150 gegenüber dem *base peak* um den Faktor 100 verstärkt gezeichnet wurden). Häufig beobachtet man außerdem gerade für diese wichtigen Peaks während der Messung starke Intensitätsänderungen, die darauf beruhen, daß die Substanzen bei der Verdampfung im Massenspektrometer teilweise thermische Zersetzungen erleiden. Bei sehr sorgfältigem und raschem Arbeiten lassen sich dennoch reproduzierbare Spektren erhalten.

Durch den Vergleich der Massenspektren des Integerressins (1) und des Integerrenins (2) mit denen ihrer Dihydroderivate sowie durch systematische Messungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie (s. Tab. im Versuchsteil) konnten die meisten Bruchstück-Ionen eindeutig zugeordnet werden. Es stellte sich dabei heraus, daß der Zerfall beider Alkaloide weitestgehend identisch ist und auch mit dem des analog gebauten, in der nachstehenden Mitteilung beschriebenen Frangulans²³⁾ übereinstimmt. Offensichtlich gehorchen Alkaloide dieses Strukturtyps unabhängig von der Art der beteiligten Aminosäuren einem allgemein anwendbaren Fragmentierungsschema, wie es auf S. 3930 wiedergegeben ist. Es sei jedoch betont, daß die als stufenweiser Abbau dargestellten Reaktionsfolgen lediglich der besseren Übersicht wegen angenommen wurden; keiner dieser Schritte läßt sich durch entsprechende metastabile Ionen belegen.

Der Molekülpeak ist nur beim Integerressin (1) eindeutig festzustellen, beim Integerrenin (2) wird er durch den ¹³C-Satelliten des verhältnismäßig intensiven M-1-Peaks verdeckt; in diesem Fall ließen sich Molekulargewicht und Summenformel über das Dihydroderivat ermitteln. Erwartungsgemäß erfolgt eine Spaltung

²³⁾ R. Tschesche, H. Last und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. 100, 3937 (1967) nachstehend.



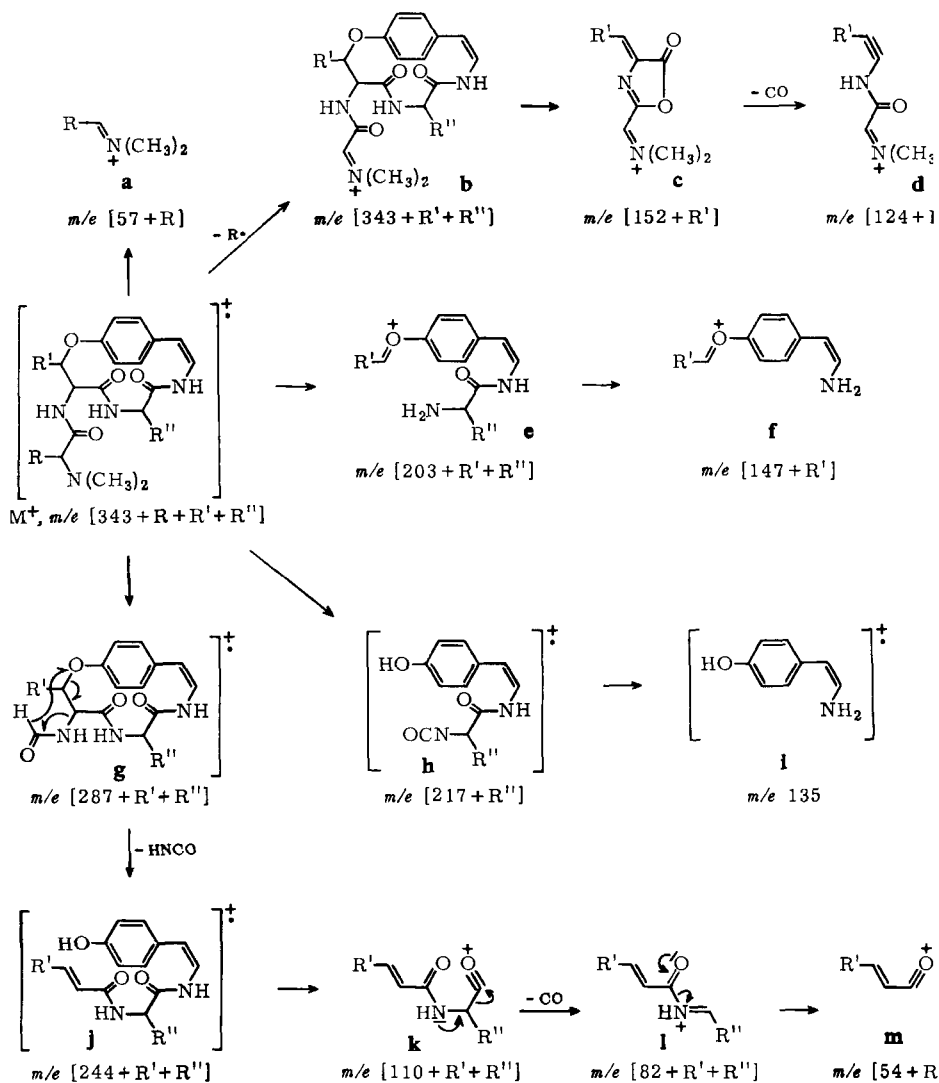
Abbild. 1 und 2. Massenspektren von Integerressin (1) und Integerenin (2)

der zum basischen Zentrum, der Dimethylaminogruppe, benachbarten C—C-Bindungen besonders leicht²⁴). Es entstehen so das schon eingangs erwähnte „Amin-

²⁴) Vgl. z. B. K. Biemann, *Mass Spectrometry*, S. 87 ff., McGraw-Hill, New York 1962.

Fragmentierungsschema

	R	R'	R''
Integerressin (1)	CH(CH ₃) ₂	C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅
Integerrenin (2)	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Frangulanin	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH(CH ₃) ₂



fragment“ der endständigen Aminosäure, **a**, und dessen Gegenstück **b**; letzteres tritt bemerkenswerterweise auch als doppelt geladenes Teilchen auf (s. Abbild. 1 und 2). Die als Zerfallsprodukte des Ions **b** angeführten Bruchstücke **c** und **d** scheinen –

wenigstens teilweise — eine Folge thermischer Reaktionen zu sein, denn ihre relative Häufigkeit nimmt bei längerer Verweilzeit der Probe in der Ionenquelle zu. Ihre Formulierung, **c** als Azlacton-ähnliche Struktur und **d** mit einer Acetylenbindung, wurde lediglich zur Verdeutlichung ihrer Herkunft aus dem Gesamtmolekül gewählt, wahrscheinlich trifft sie nicht den wahren Charakter dieser Ionen.

Die für eine Strukturermittlung bedeutsamsten Fragment-Ionen werden durch Öffnung des Ringsystems am Äthersauerstoff und den nachfolgenden, dem Zerfall linearer Peptide²⁵⁾ analogen, stufenweisen Abbau an den Amidgruppen gebildet¹⁾: Eine Homolyse der dem Äthersauerstoff benachbarten C—C-Bindung führt so zu den Oxonium-Ionen **e** und **f**, und die für Phenoläther typische Spaltung in Olefin und Phenol-Ion²⁶⁾ ergibt die Fragmente **h** und **i**. Eine andere Reaktionsfolge wird offenbar durch die successive Abspaltung der Seitenkette eingeleitet, die über die Formamid-Zwischenstufe **g** (dieser Peak wird stets von einem um 2 Masseneinheiten niedriger liegenden begleitet, der einem Isocyanat-Ion entsprechen dürfte) zu **j** führt. Dieser Übergang ist im Formelschema stark vereinfachend wiedergegeben. Wahrscheinlich geschieht die Eliminierung von Isocyanäure aus **g** unter Beteiligung der im Ring befindlichen Carbonylgruppe im Sinne einer „McLafferty-Umlagerung“²⁷⁾, und erst anschließend öffnet sich der Ring durch die übliche Phenoläther-Spaltung, wobei das beim ersten Schritt auf die Carbonylgruppe übertragene Wasserstoffatom möglicherweise ein zweites Mal verschoben wird. Ausgehend von **j** läßt sich die Bildung der Fragmente **k** bis **m** zwanglos erklären.

Für die Konstitution des 14-gliedrigen Ringsystems sind besonders die folgenden Bruchstücke aufschlußreich: **f** und **h** zeigen, welche Aminosäure mit dem *p*-Hydroxystyrylamin über den Sauerstoff bzw. über den Stickstoff verknüpft ist; **e** und **k** (sowie **l**), die jeweils beide am Ringsystem beteiligten Aminosäuren enthalten, und zwar einmal direkt miteinander verknüpft, das andere Mal über das *p*-Hydroxystyrylamin, beweisen die Größe und Anordnung des Ringsystems.

Die einzelnen „Untereinheiten“ des Moleküls erkennt man am besten an den Ionen **a**, **i** und **m**⁸⁾ sowie an dem für die ringständige *einfache* Aminosäure zu erwartenden „Aminfragment“²⁵⁾ ($\text{H}_2\ddot{\text{N}}=\text{CH}-\text{R}'$, *m/e* 120 bei **1** und *m/e* 86 bei **2**). **m** stellt beim Integerressin und beim Integerrenin ein Cinnamoyl-Ion dar ($\text{R}' = \text{C}_6\text{H}_5$); ähnlich wie beim Zerfall von Zimtsäureestern²⁸⁾ beobachtet man daher eine weitere Abspaltung von Kohlenmonoxid zu einem Ion der Masse 103 (*m** gef. 81,0, ber. 81,0). Auch das Fragment-Ion **a** erleidet, wie von entsprechenden metastabilen Ionen angezeigt wird, eine Reihe von Sekundärerzfällen, von denen jedoch nur einer für die Struktur der *N,N*-Dimethyl-aminosäure charakteristisch zu sein scheint: Beim Vorliegen einer am β -C-Atom verzweigten Aminosäure wird einer dieser Alkylreste

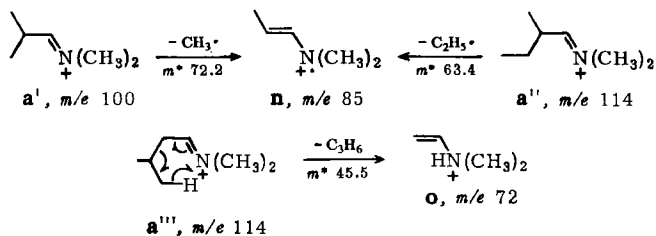
25) K. Heyns und H.-F. Grützmaier, Tetrahedron Letters [London] 1963, 1761; Liebigs Ann. Chem. 669, 189 (1963); F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel und K. K. Sun, Z. Naturforsch. 20b, 1169 (1965).

26) 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).

27) F. W. McLafferty, Determination of Organic Structures by Physical Methods, Bd. 2, S. 129—149, Academic Press, New York 1962.

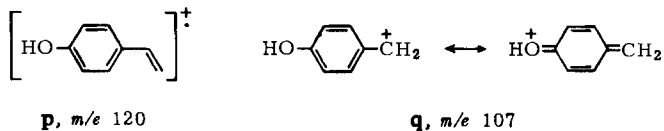
28) E. M. Emery, Analytic. Chem. 32, 1495 (1960).

(bei ungleichen Resten der größere) abgespalten. Bei dem aus dem Integerressin (1) stammenden Ion **a'** findet man also den Verlust eines Methyl-Radikals, bei dem vom Integerrenin (2) herrührenden Ion **a''** die Abspaltung eines Äthyl-Radikals; in beiden Fällen entsteht dadurch das Radikal-Ion **n**. — Die zum Vergleich aufgenommenen



Massenspektren des *N,N*-Dimethyl-leucins und -isoleucins zeigten, daß hiermit eine einfache und sichere Möglichkeit zur Unterscheidung dieser beiden Isomeren vorliegt: Anstelle eines dem Radikal-Ion **n** analogen Bruchstücks liefert nämlich das „Aminfragment“ des *N,N*-Dimethyl-leucins (**a'''**) unter Eliminierung von Propen das eine gerade Elektronenzahl aufweisende Ion **o**, eine Reaktion, die auch beim Leucin selbst stattfindet²⁹⁾.

Daß die C=C-Doppelbindung in den Alkaloiden für die Fragmentierung keine entscheidende Rolle spielt, zeigen die Massenspektren der beiden Dihydroderivate. Sie weisen nur zwei charakteristische Abweichungen gegenüber dem beschriebenen Zerfallsschema auf: Anstelle eines Peaks bei der Massenzahl 135 (**i**) treten zwei neue bei *m/e* 120 und 107 auf, die den Bruchstück-Ionen **p** und **q**³⁰⁾ zukommen, und für das Fragment **h** findet man überraschenderweise einen um drei Masseneinheiten ver-



schobenen Peak. Die Ursache hierfür dürfte wohl in der unterschiedlichen Stabilisierung der positiven Ladung zu suchen sein, in **h** ist dafür wahrscheinlich das Styryl-System, bei den Hydrierungsprodukten aber möglicherweise eine Endgruppe der Struktur $\text{O} \equiv \text{C}-\text{NH}-\dots$ verantwortlich. Alle übrigen Bruchstücke erscheinen — soweit sie die *p*-Hydroxy-styrylamid-Gruppierung enthielten, um zwei Masseneinheiten verschoben — in den Spektren der Dihydroderivate ebenfalls.

Diese massenspektrometrischen Fragmentierungen, die im Ergebnis zahlreichen chemischen Abbaureaktionen entsprechen, ermöglichen die eindeutige Zuordnung der Aminosäurereste R, R' und R'' und beweisen gleichzeitig die vom *p*-Hydroxy-styrylamin ausgehende Verknüpfung zu einem 14-gliedrigen Ringsystem. Damit sind die Strukturen des Integerressins (1) und des Integerrenins (2) gesichert.

²⁹⁾ K. Biemann, J. Seibl und F. Gapp, J. Amer. chem. Soc. **83**, 3795 (1961).

³⁰⁾ Aufgrund der Möglichkeit zur Resonanzstabilisierung der positiven Ladung liegt **q** wahrscheinlich, wie angegeben, als *p*-Hydroxy-benzylum-Ion vor und nicht als Hydroxy-tropylium-Ion; vgl. die Diskussion von H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds, S. 173f., Holden-Day, San Francisco 1964.

Wieweit sich das beschriebene Zerfallsschema zur Strukturermittlung weiterer verwandter Alkaloide eignet, muß sich in der Zukunft erweisen. Daß gewisse Abweichungen auftreten können, zeigt das Massenspektrum des Scutianins, das eine um eine Aminosäure verlängerte Seitenkette besitzt¹⁾. Ihm fehlen die für die Ionen e, k und l zu erwartenden Peaks, dafür erscheinen andere, auf die längere Seitenkette zurückzuführende Bruchstück-Ionen.

Herrn Doz. Dr. G. Snatzke danken wir sehr für die Aufnahme und Diskussion des Circular-dichroismus, Herrn Dr. Th. Hartmann vom Institut für Pharmakognosie der Universität Bonn für die Beschaffung des Pflanzenmaterials, der Firma H. Finzelberg's Nachf., Andernach, für die Herstellung des Rohextraktes und der Stiftung Volkswagenwerk für die zur Anschaffung des Massenspektrometers zur Verfügung gestellten Mittel.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand, die optischen Drehungen mit dem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium unseres Institutes ausgeführt. Zur Aufnahme der Absorptionsspektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 (IR), Varian A 60 (NMR), Cary 14 (UV) und Dichrograph Roussel-Jouan (Circulardichroismus = CD). Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer MS 9 (A. E. I.) durch Verdampfen der Substanzen direkt in der Ionenquelle (Temperatur ca. 200°) bei einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen; zur exakten Massenbestimmung arbeitete man bei einem Auflösungsvermögen von etwa 14000 (10%-Tal-Definition) mit Perfluor-tributylamin als Referenzsubstanz (Meßergebnisse s. Tab.). — Zur Dünnschichtchromatographie dienten Kieselgel G,

Durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelte Summenformeln

Ion	Summenformel	Meßwert	Abweichung in mmu	Summenformel	Meßwert	Abweichung in mmu
<i>Integerressin (1)</i>				<i>Integerrenin (2)</i>		
M ⁺	C ₃₃ H ₃₈ N ₄ O ₄	554.2878	-1.5	C ₃₁ H ₄₁ N ₄ O ₄	533.3117	-1.1
M-H	—	—	—	C ₃₀ H ₃₀ N ₄ O ₄	519.2967	-0.4
M-CH ₃	C ₃₂ H ₃₅ N ₄ O ₄	539.2660	+0.2	C ₂₉ H ₃₇ N ₄ O ₄	505.2806	-0.9*)
M-C ₂ H ₅	—	—	—	C ₇ H ₁₆ N	114.1283	—
a	C ₈ H ₁₄ N	100.1127	+0.1	C ₂₇ H ₃₃ N ₄ O ₄	477.2500	-0.2
b	C ₃₀ H ₃₁ N ₄ O ₄	511.2350	+0.5	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₂	229.0976	-0.1*)
c	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₂	229.0979	+0.2	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O	201.1030	+0.2
d	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O	201.1028	—	C ₂₁ H ₂₅ N ₂ O ₂	337.1916	—
e	C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₂	371.1758	-0.1	C ₁₅ H ₁₄ NO	224.1073	-0.2
f	C ₁₅ H ₁₄ NO	224.1073	-0.2	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	421.1998	-0.3
g	C ₂₇ H ₂₅ N ₃ O ₄	455.1847	+0.2	C ₂₄ H ₂₅ N ₃ O ₄	419.1837	-0.8
g-H ₂	—	—	—	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃	274.1313	-0.4
h	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	308.1158	-0.3	C ₈ H ₉ NO	135.0682	-0.2
i	C ₈ H ₉ NO	135.0682	-0.2	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	378.1945	+0.2
j	C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₃	412.1783	-0.4	C ₁₅ H ₁₈ NO ₂	244.1330	-0.7
k	C ₁₈ H ₁₆ NO ₂	278.1175	-0.6	C ₁₄ H ₁₈ NO	216.1388	—
l	C ₁₇ H ₁₆ NO	250.1233	+0.1	C ₆ H ₇ O	103.0546	-0.2
m	C ₉ H ₇ O	131.0498	+0.1	C ₅ H ₇	103.0546	-0.2
m-CO	C ₈ H ₇	103.0548	—	C ₅ H ₁₁ N	85.0891	—
n	C ₅ H ₁₁ N	85.0892	+0.1**)	C ₅ H ₁₂ N	86.0969	-0.1
H ₂ N=CH-R''	C ₈ H ₁₀ N	120.0812	-0.1	—	—	—
<i>Dihydrointegerressin</i>				<i>Dihydrointegerrenin</i>		
M ⁺	C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₄	556.3055	+0.6	C ₃₁ H ₄₄ N ₄ O ₄	536.3346	-1.6
h+3H	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₃	311.1392	-0.4	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₃	277.1548	-0.4
p	—	—	—	C ₆ H ₈ O	120.0577	+0.2**)
q	C ₇ H ₇ O	107.0498	+0.1	C ₇ H ₇ O	107.0499	+0.2

*) Diese Ionen machen etwa 65–70% der Peak-Intensität aus; der Rest besteht aus Bruchstücken anderer Zusammensetzung.

**) Diese Ionen machen etwa 80–85% der Peak-Intensität aus; der Rest besteht aus Bruchstücken anderer Zusammensetzung.

HF₂₅₄ oder PF₂₅₄ (Merck) sowie Aluminiumoxid neutral (Woelm), zur Papierchromatographie die Sorte 2043 b (Schleicher & Schüll). Für die Säulenchromatographie benutzte man Aluminiumoxid neutral (Woelm) bzw. Kieselgel einheitlicher Korngröße (Gebr. Herrmann, Köln).

Isolierung der Rohalkaloide: 30 kg fein zerkleinerte Wurzeln von *Ceanothus integerrimus* wurden mit Äthylenchlorid/Methanol (2 : 1) erschöpfend extrahiert. Den Auszug engte man i. Vak. weitgehend ein und nahm ihn dann in 25 l Methanol auf. Jeweils 1 l davon wurde mit 500 ccm Wasser versetzt, durch Zugabe von etwa 50–60 ccm 2*n* Ammoniak auf pH 8–9 gebracht und die Lösung viermal mit je 300 ccm Benzol ausgeschüttelt. Die vereinigten benzolischen Lösungen extrahierte man dreimal mit je 300 ccm 2proz. wäbr. Citronensäure, machte diese dann ammoniakalisch und zog sie dreimal mit je 300 ccm Chloroform aus. Durch Abdampfen des Chloroforms i. Vak. erhielt man die *Rohalkaloide* als hellbraunes, amorphes Material (Gesamtausbeute 20.5 g).

Abtrennung des Integerressins (1) und des Integerrenins (2): 6.2 g Rohbasengemisch chromatographierte man an 600 g Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe IV. Mit Benzol und Benzol/Chloroform (17 : 3) wurden 17 mg unpolarer Verunreinigungen eluiert, mit Benzol/Chloroform (7 : 3) erhielt man zunächst 562 mg *Integerrenin* (2), dann 964 mg einer Mischfraktion aus beiden Alkaloiden und schließlich 2.36 g *Integerressin* (1). Die Mischfraktionen ließen sich an der 250fachen Menge Kieselgel mit Chloroform/Aceton/Methanol (92 : 7 : 1) als Elutionsmittel fast vollständig auftrennen; aus 2.0 g Mischfraktion (von zwei Ansätzen) wurden so weitere 432 mg 2 und 1.13 g 1 gewonnen. Beide Alkaloide kristallisierten aus Chloroform/Petroläther in farblosen Nadeln; ihre analytischen Daten sind:

Integerressin (1): Schmp. 285° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: -164° ($c = 0.2$, Chloroform).

C₃₃H₃₈N₄O₄ (554.7) Ber. C 71.45 H 6.91 N 10.10 Gef. C 71.34 H 7.08 N 9.94

IR (KBr): 3295 (NH), 2795 (NCH₃), 1675 und 1630 (Amide) und 1232/cm (Phenoläther).

NMR (CF₃CO₂H): $\tau = 9.05$ (d, $J = 7$ Hz, $\text{>CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$), 7.80 und 7.19 (je d, $J = 4.5$ Hz, $-\text{N}(\underline{\text{CH}_3})_2$).

UV (Methanol): Schultern bei 252 ($\log \epsilon = 3.77$) und 280 m μ ($\log \epsilon = 3.22$).

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = +1.5$ (285 m μ) und -19.0 (238 m μ).

Integerrenin (2): Schmp. 278° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: -228° ($c = 0.2$, Chloroform).

C₃₁H₄₂N₄O₄ (534.8) Ber. C 69.72 H 7.93 N 10.55 Gef. C 69.13 H 8.11 N 10.66

IR (KBr): 3275 (NH), 2785 (NCH₃), 1680 und 1630 (Amide) und 1226/cm (Phenoläther).

NMR (CF₃CO₂H): $\tau = 9.07$ (breites Signal, C-Methylgruppen), 8.55 (breites Signal, C-CH₂-C), 7.90 und 7.17 (je d, $J = 4$ Hz, $-\text{N}(\underline{\text{CH}_3})_2$); in CDCl₃: $\tau = 9.68$ (d, $J = 6.5$ Hz, $\text{>CH}-\underline{\text{CH}_3}$ des *N,N*-Dimethyl-isoleucins), 9.22 (t, $J = 6.5$ Hz, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$), 9.20 (d, $J = 7$ Hz, $\text{>CH}(\underline{\text{CH}_3})_2$) und 8.16 (s, $-\text{N}(\underline{\text{CH}_3})_2$).

UV (Methanol): Schultern bei 252 ($\log \epsilon = 3.70$) und 280 m μ ($\log \epsilon = 3.13$).

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = +1.4$ (286.5 m μ) und -21.5 (239 m μ).

Dihydrointegerressin: 400 mg 1 wurden in 300 ccm Methanol über 80 mg PtO₂ bei Normaldruck hydriert. Nach 12 Std. waren 16.2 ccm Wasserstoff (= 1.0 Äquiv.) aufgenommen worden. Man filtrierte vom Katalysator ab und verjagte das Methanol i. Vak. Der Rückstand (383 mg) lieferte durch Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther Nadeln vom Schmp. 321°. $[\alpha]_D^{20}$: -74.6° ($c = 0.13$, Chloroform). Die Summenformel des *Dihydrointegerressins* wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie zu C₃₃H₄₀N₄O₄ bestimmt (s. Tab.).

IR (KBr): 3290 (NH), 2798 (NCH₃), 1637 (Amide) und 1230/cm (Phenoläther).

NMR (CF₃CO₂H): $\tau = 9.09$ (d, $J = 6.5$ Hz, $\text{>CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.85 und 7.20 (je d, $J = 4.5$ Hz, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 276$ m μ ($\log \epsilon = 3.04$), Schulter bei 230 m μ ($\log \epsilon = 4.10$).

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = +1.3$ (280 m μ) und -3.9 (238 m μ).

Dihydrointegerrenin: 176 mg **2**, gelöst in 80 ccm Methanol, nahmen über 30 mg vorhydriertem PtO₂ innerhalb 8 Stdn. 7.4 ccm Wasserstoff auf (= 1.0 Äquiv.). Man arbeitete, wie oben beschrieben, auf und erhielt aus Chloroform/Petroläther Nadeln vom Schmp. 318°. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.2^\circ$ ($c = 0.13$, Chloroform). Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurde die Summenformel des *Dihydrointegerrenins* zu C₃₁H₄₄N₄O₄ bestimmt (s. Tab.).

IR (KBr): 3290 (NH), 2780 (NCH₃), 1630 (Amide) und 1223/cm (Phenoläther).

NMR (CF₃CO₂H): $\tau = 9.07$ (breites Signal, C-Methylgruppen), 8.5–8.6 (m, C–CH₂–C), 7.90 und 7.13 (d, $J = 4.5$ Hz, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}} = 277$ ($\log \epsilon = 3.09$) und 227 m μ ($\log \epsilon = 4.09$).

CD (Dioxan): $\Delta\epsilon_{\text{max}} = +1.1$ (280 m μ) und -2.1 (240 m μ).

Saure Hydrolysen: Jeweils etwa 20 mg **1** oder **2** oder von deren Dihydroderivaten wurden mit 1 ccm 6*n* HCl in ein starkwandiges Glasrohr eingeschmolzen und 12 Stdn. auf 120° erhitzt. Das erhaltene Reaktionsgemisch ließ man im Exsikkator über KOH zur Trockne eindunsten, nahm in wenig Wasser auf und chromatographierte dann zusammen mit den Vergleichssubstanzen. Für die Papierchromatographie wurden folgende Fließmittelsysteme benutzt:

1. n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5, obere Phase)³¹⁾
2. n-Butanol/Aceton/Wasser/Propionsäure (10 : 10 : 5 : 2)³²⁾
3. n-Butanol, gesättigt mit Citratpuffer vom pH 4³³⁾
4. n-Butanol/Benzylalkohol (1 : 1), gesättigt mit Boratpuffer vom pH 8.4³³⁾.

Bei den Systemen 3 und 4 wurde das Papier jeweils vorher mit der entsprechenden Pufferlösung imprägniert und im Durchlaufverfahren gearbeitet; die Laufzeiten betragen zum Nachweis der freien Aminosäuren etwa 40 Stdn., für die *N,N*-Dimethyl-aminosäuren und das Tyramin etwa 35 Stdn. In beiden Systemen ist vor allem die einwandfreie Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin – auch bei ihren *N,N*-Dimethyl-Derivaten – möglich. Als Anfärbereagentien wurden Ninhydrin (für die freien Aminosäuren), Joddampf (*N,N*-Dimethyl-aminosäuren) und Diazosulfanilsäure (Tyramin) benutzt. – Der Nachweis des β -Phenyl-naphthalins erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel PF₂₅₄ mit Benzol/Chloroform (2 : 1) als Laufmittel und Chromschwefelsäure als Anfärbereagenz. Es wurden so identifiziert:

Integerressin (**1**): Phe, (CH₃)₂Val und β -Phenyl-naphthalin.

Dihydrointegerressin: Phe, (CH₃)₂Val, Tyramin und β -Phenyl-naphthalin; nach einer Hydrolyse mit 3*n* HCl (statt 6*n* HCl) ließ sich in Spuren auch 3 Hyphe nachweisen.

Integerrenin (**2**): Leu, (CH₃)₂Ile und β -Phenyl-naphthalin.

Dihydrointegerrenin: Leu, (CH₃)₂Ile, Tyramin und β -Phenyl-naphthalin.

³¹⁾ I. M. Hais und K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. I, S. 597, G. Fischer Jena 1963.

³²⁾ G. W. Kenner und R. C. Sheppard, Nature [London] **181**, 48 (1958).

³³⁾ F. McFarren, Analytic. Chem. **23**, 168 (1951).

Präparative Trennung der Hydrolysenprodukte

a) *Dihydrointegerressin*: 700 mg wurden mit 30 ccm 6*n* HCl im Bombenrohr 12 Stdn. auf 120° erhitzt. Dann verdünnte man mit Wasser und extrahierte mehrmals mit Benzol. Durch Eindampfen der Benzolphasen erhielt man 27 mg braunen Rückstand, aus dem durch Umkristallisieren aus Äthanol 6 mg β -Phenyl-naphthalin vom Schmp. 101° (Lit.²²): 103°) gewonnen werden konnten; eine Mischprobe und die IR-Spektren (KBr) bewiesen die Identität mit dem authent. Material. Die wäßr. Phase wurde i. Vak. zur Trockne gebracht, dann nahm man in 100 ccm Wasser auf, filtrierte von Ungelöstem ab, gab die Lösung auf 40 ccm Dowex 50 (saure Form) und wusch mit 100 ccm Wasser nach; die Waschwässer wurden verworfen. Dann wurde mit 150 ccm 3proz. wäßr. Ammoniak eluiert. Nach Abdampfen dieser Lösung erhielt man 417 mg Rückstand, der in 100 ccm Wasser aufgenommen und auf 20 ccm Amberlite IRC 50 (saure Form) gegeben wurde. Durch Elution mit 100 ccm Wasser erhielt man 343 mg Aminosäuregemisch, anschließend wurde mit 3proz. wäßr. Ammoniak chromatographisch einheitliches *Tyramin* (63 mg Eindampfrückstand) eluiert. Es wurde in wenig Äthanol gelöst, dann gab man äthanol. Salzsäure hinzu und dampfte zur Trockne ein; das gebildete *Tyramin-hydrochlorid* ergab aus Methanol/Äther farblose Nadeln vom Schmp. 269° (Lit.³⁴): 272°; eine Mischprobe und die IR-Spektren bewiesen die Identität). Das obige Aminosäuregemisch wurde an 15 g Aktivkohle/Celite (2 : 1) mit verd. Essigsäure als Elutionsmittel chromatographiert. 5proz. Essigsäure eluierte zunächst 123 mg $(CH_3)_2Val$, dann 85 mg Mischfraktionen, mit 20proz. Essigsäure wurden schließlich 67 mg *Phe* abgelöst. Das $(CH_3)_2Val$ wurde durch Sublimation i. Vak. bei 100° gereinigt; Schmp. 153° (Lit.¹¹): 154°), $[\alpha]_D^{20}$: +41.2° (*c* = 0.13, Wasser) (Lit.²¹): +40.6° für die L-Form). Das *Phe* wurde aus Wasser/Aceton umkristallisiert; $[\alpha]_D^{20}$: -32.8° (*c* = 0.21, Wasser) (Lit.³⁵): -35.1° für die L-Form).

b) *Dihydrointegerrenin*: 500 mg wurden, wie oben beschrieben, hydrolysiert und -- abgesehen von der Trennung des Aminosäuregemisches -- analog weiterverarbeitet. Man erhielt dabei 4 mg β -Phenyl-naphthalin, 47 mg *Tyramin* und 220 mg Aminosäuregemisch, das durch fraktionierte Vakuumsublimation getrennt wurde: Bei etwa 80–90° ließen sich 48 mg reines $(CH_3)_2Ile$ vom Schmp. 173° (Lit.¹¹): 178°), $[\alpha]_D^{20}$: +47.8° (*c* = 0.2, Methanol) (Lit.¹¹): +50° für die L-Form), auffangen und bei etwa 150–160° erhielt man 63 mg reines *Leu*, $[\alpha]_D^{20}$: -11.5° (*c* = 0.23, Wasser) (Lit.³⁶): -10.4°).

³⁴) E. Waser, Helv. chim. Acta **8**, 767 (1925).

³⁵) E. Fischer und W. Schoeller, Liebigs Ann. Chem. **357**, 9 (1907).

³⁶) F. Ehrlich und A. Wendel, Biochem. Z. **8**, 399 (1908).