

SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

Der Mangan- und Kupfergehalt von Chloroplasten und Cytoplasten

Die Fraktionierung von pflanzlichen Zellen und Geweben wurde bisher hauptsächlich in wässrigem oder nichtwässrigem Milieu durchgeführt. Zur Isolierung von Chloroplasten entwickelten BEHRENS et al.¹ eine neue Methode: Gefriergetrocknete Blätter werden fein pulverisiert und auf trockenem Wege in einzelne Zellfraktionen (Chloroplasten verschiedenen Reinheitsgrades, Cytoplasten) zerlegt. Durch den Ausschluss von Flüssigkeiten werden bei dieser Trennmethode Verluste und Verlagerungen von Substanzen durch Auswaschen, Diffusion und dergleichen vermieden.²

In 4 verschiedenen Fraktionen, die auf diesem Wege aus Blättern von Feldsalat (*Valerianella olitoria*) gewonnen wurden (Fraktion I: Chloroplasten ca. 90%iger Reinheit; Fraktion II und III: Chloroplasten ca. 70 bzw. 50%iger Reinheit; «Abfall»: Vornehmlich Cellulosemembranen und Cytoplasten mit ca. 10% Chloroplasten-Anteil), bestimmten HERRMANN und NEU² durch Anwendung von Atomabsorptionsverfahren den Magnesium- und Zinkgehalt.

Als Fortsetzung zu dieser Arbeit stellten wir uns die Aufgabe, in aliquoten Anteilen von 3 der obengenannten Fraktionen (I, III und «Abfall») sowie in einer aus einer anderen Charge gewonnenen, vorwiegend aus Cytoplasten bestehenden Fraktion den Mangan- und Kupfergehalt zu bestimmen³. Da die Mengen an Trockensubstanz gering waren, wurden empfindliche und spezifische, von uns ausgearbeitete katalytische Analysenmethoden eingesetzt⁴:

Schon geringste Mengen an Mn^{++} katalysieren die Oxydation von Diäthylanilin (0,0002 M) mit Na_2JO_4 (0,002 M) zu einem dichinoiden, gelb gefärbten Reaktionsprodukt, dessen Extinktion bei 470 nm mit einem Spektralphotometer gemessen wird. Die Reaktion verläuft optimal in Gegenwart von 0,01 M Phosphat- und Zitratpuffer bei pH 6; 25°C und 5 min Reaktionszeit. Die Grenzkonzentration beträgt 0,4 ng Mn/ml. Durch geringste Mengen an Cu^{++} wird die Oxydation von Hydrochinon (0,04 M) mit H_2O_2 (1%ig), in Gegenwart von Pyridin (0,1 M) als Aktivator, zu einem rot gefärbten Reaktionsprodukt katalysiert. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 470 nm. Die Gegenwart von 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7) ist notwendig. (Reaktionstemperatur: 25°C; Reaktionszeit: 5 min; Grenzkonzentration: 4 ng Cu/ml.)

Die nach ¹ aus gefriergetrockneten Blättern von *V. olitoria* gewonnenen, trockenen Fraktionen (I, III, «Abfall» und «Cytoplasten») wurden gewogen und in einem neuartigen Veraschungsgerät («Low Temperature Asher LTA 500» der Firma Tracerlab S.A., Richmond, Kalifornien) verascht⁴.

In diesem Gerät erfolgt die Veraschung in einem durch ein hochfrequentes elektromagnetisches Feld angeregten

¹ M. BEHRENS, W. NEU, R. THALACKER und H. J. THIMM, *Experientia* 20, 607 (1964).

² R. HERRMANN und W. NEU, *Experientia* 21, 436 (1965).

³ Die Proben wurden uns von den Herren Prof. Dr. M. BEHRENS und Prof. Dr. R. HERRMANN freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

⁴ Dissertation von F. DITTEL, Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Giessen (1965).

Der Mangan- und Kupfergehalt in Chloroplasten-Fractionen verschiedenen Reinheitsgrades sowie in Cytoplasten von *Valerianella olitoria* (Mittelwerte aus je 3 Parallelbestimmungen)

Fraktion	% Asche in Trockensubstanz	Mn-Gehalt in ppm ^a in		Cu-Gehalt in ppm in		Prozentuale Verteilung von Mn und Cu auf die untersuchten Fraktionen (Trockensubstanz)	
		Trockensubstanz	Asche	Trockensubstanz	Asche	Mangan (%)	Kupfer (%)
I (90% Chloroplasten)	6	72	1202	236	3943	15	43,5
III (50% Chloroplasten)	16	277	1731	271	1696	59	50
«Abfall» (Cellulosemembranen und Cytoplasten mit 10% Chloroplasten)	10,6	117	1102	29	272	25	5,5
«Cytoplasten» (90% Cytoplasten)	20,6	4,5	22	5	24	1	1

^a 1 ppm = 0,0001%.

Sauerstoffstrom, dessen hohes Reaktionsvermögen die Oxydation des in geschlossenen Gefässen befindlichen, getrockneten organischen Materials ohne nennenswerte Verkohlungs bereits bei 100–150°C ermöglicht. Hierdurch werden Substanzverluste durch Verflüchtigung oder Reaktion mit dem Gefässmaterial weitgehend vermieden⁵.

Die Asche wurde gewogen, ein- bis zweimal mit gereinigter, verdünnter HCl abgeraucht, schliesslich mit 1 n HCl aufgenommen und mit H₂O bidestilliert auf 10 ml aufgefüllt. Aus diesen Lösungen, die jeweils die Asche der gesamten Probe enthielten, wurden aliquote Teile entnommen und mit den oben beschriebenen Methoden, unter Anwendung eines «Zugabeverfahrens mit rechnerischer Auswertung» (zur Ausschaltung von eventuellen Störeinflüssen durch andere Elemente⁴) auf ihren Mangan- und Kupfergehalt untersucht. Pro Probe und Element wurden jeweils 3 Parallelbestimmungen durchgeführt. Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst.

Setzt man die Summe der in der Trockensubstanz der 4 Fraktionen gefundenen ppm-Gehalte gleich 100, ergibt sich für die Verteilung der beiden Elemente auf die 4 Fraktionen folgendes Bild (vgl. Tabelle): Kupfer ist zu 93,5% in den Fraktionen III und I angereichert und zu etwa gleichen Anteilen auf diese beiden Fraktionen verteilt. Mangan verteilt sich überwiegend auf die Fraktion III und auf den «Abfall», während auf Fraktion I nur ein Anteil von 15% entfällt. Die «Cytoplasten» enthalten einen vernachlässigbaren Anteil an den beiden Elementen.

Aus den Analysenergebnissen lässt sich lediglich der Schluss ziehen, dass Kupfer vornehmlich in den an

Chloroplasten reicheren Fraktionen auftritt, während Mangan hauptsächlich in den an Chloroplasten ärmeren Fraktionen zu finden ist.

Um sichere Aussagen über die Verteilung der beiden Elemente auf die einzelnen Zellfraktionen von *V. olitoria* machen zu können, dürfte eine grössere Anzahl weiterer Untersuchungen in noch schärfer getrennten Fraktionen erforderlich sein⁶.

Summary. Employing catalytic methods, the Mn- and Cu-content was determined in different cell fractions (chloroplasts, cytoplasts) of freeze-dried leaves of *Valeriana olitoria* isolated with a new dry method by BEHRENS et al.¹. Cu was found essentially in the fractions with high chloroplast content; Mn was found mainly in the fractions with low chloroplast content.

F. DITTEL und CHRISTA SAGEL

*Institut für Ernährungswissenschaft der Justus Liebig-Universität, Giessen (Deutschland),
10. November 1966*

⁵ C. GLEIT und W. HOLLAND, *Analyt. Chem.* **34**, 1454 (1962).

⁶ Den Herren Prof. Dr. M. BEHRENS und Prof. Dr. R. HERRMANN danken wir für die uns freundlicherweise zur Verfügung gestellten isolierten Zellfraktionen, Herrn Prof. Dr. H. D. CREMER für die Ermöglichung dieser Arbeit, Frau U. WRUCK für die Mithilfe bei der Durchführung der Analysen. Dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie danken wir für die Unterstützung im Rahmen des Forschungsvorhabens J 205.

Chemical Examination of the Roots of *Cissampelos pareira* Linn. Part V. Structure and Stereochemistry of Hayatidin

The structures of hayatinin and hayatins, two of the bis-benzyltetrahydroisoquinoline alkaloids isolated from the roots of *Cissampelos pareira* Linn. (Menispermaceae), were discussed earlier^{1,2}. In the present communication, the structure and stereochemistry of another alkaloid – hayatidin³, isolated from the same plant – are described.

Hayatidin, m.p. 179–180°; $[\alpha]_D^{25} - 109^\circ$ (pyridine); $\lambda_{max} = 280$ nm ($\log \epsilon = 3.07$) (EtOH-H₂O, 4:1); $\lambda_{max} = 287$ nm ($\log \epsilon = 2.97$) (EtOH-N·NaOH, 4:1); corresponded to the molecular formula C₃₇H₄₀N₂O₆ (mol. weight = 608 by mass spectrometry). Its proton magnetic resonance (p.m.r.) spectrum showed that it had 10 aromatic protons including one at τ 4.12 characteristic of a C-8 proton highly shielded by the aromatic ring of a benzyl group⁴, 3 of OMe and 2 of NMe groups.

The mass spectrum of hayatidin showed abundant ions at m/e 312, 298, 296, 191, 190, 174, 162, 148 and 145. There were small peaks at m/e 608 (M⁺), 593, 501, 487, and a characteristic though much smaller peak at m/e 258.5 $[(M - 91)/2]^+$ ⁵.

Hayatidin was ethylated with triethylanilinium hydroxide. The ethyl ether which could not be crystallized gave only a single spot on thin layer chromatography (t.l.c.) (silica gel; system: benzene, ethyl acetate and diethylamine, 7:2:1), showed abundant ions at m/e 326,

312 and 296 in the mass spectrum and had an IR-spectrum identical with that of the *O*-ethyl derivative of (+)-4''-*O*-methylcurine. It was therefore apparent that hayatidin was a stereoisomer of (+)-4''-*O*-methylcurine isolated by HAYNES et al.⁶ from *Cissampelos pareira* Linn. of Jamaican origin.

In order to study the stereochemistry at the 2 centres in this alkaloid, hayatidin ethyl ether was subjected to sodium and liquid ammonia reduction. The phenolic fragment, which was laevorotatory, could not be obtained in the crystalline form but had the same R_f on t.l.c. as *N*-methylcoclaurine. Further, the IR-spectrum of *O,O'*-dimethyl methiodide of this compound, m.p. 131°, was identical with that of an authentic sample of the methiodide of *l-O,O',N*-trimethylcoclaurine. This confirms

¹ A. K. BHATNAGAR and S. P. POPLI, *Indian J. appl. Chem.*, in press.

² A. K. BHATNAGAR, S. BHATTACHARJI, A. C. ROY, S. P. POPLI and M. L. DHAR, *J. org. Chem.*, in press.

³ S. BHATTACHARJI and M. L. DHAR, International Symposium on Medicinal Plants, held under the auspices of UNESCO and the Government of Ceylon (Kandy, Ceylon; 15–18th December, 1964).

⁴ D. R. DALTON, M. P. CAVA and K. T. BUCK, *Tetrahedron Lett.* **1965**, 2687.

⁵ J. BALDAS, Q. N. PORTER, I. R. C. BICK and M. J. VERNANGO, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 2059.

⁶ L. J. HAYNES, E. J. HERBERT and J. R. PLIMMER, *J. chem. Soc.*, **1966**, 615.