

Identification of these products was made by spectral methods, followed by comparison with authentic samples⁶. Neither of these flavonoids have been reported in *P. parviflora*⁷, but pinostrobin was detected in *P. formosana* by a paper chromatography screening procedure⁸. It is

concluded that the formosan pine is correctly placed in the subgenus Haploxylon².

During this investigation, mass spectra were determined for both pinostrobin and tectochrysin. Due to the paucity of such data in the literature⁹⁻¹¹, there is given here a summation of the significant break-down patterns on these two compounds:

Pinostrobin: $m/e = 270$ (M^+), 269 (M^+-1), 193 ($M^+-C_6H_5$), 166 ($C_8H_6O_4^+$), 138 ($C_7H_6O_3^+$), 123 ($C_6H_8O_3^+$), 104 ($C_8H_8^+$), and 77 ($C_6H_5^+$); Tectochrysin: $m/e = 268$ (M^+), 240 (M^+-CO), 226 ($240-CH_2$), 166 ($C_7H_4O_2^+$), 138 ($C_7H_6O_2^+$), 102 ($C_8H_6^+$), and 77 ($C_6H_5^+$).

Zusammenfassung. Die Untersuchung der sauren Anteile eines Extraktes des Kernholzes von *Pinus formosana* zeigte das Vorhandensein von Pinostrobin und Tectochrysin neben Dehydroabietin- und Isodextroprimarsäure. Diese Befunde erlauben, *P. formosana* der Gruppe Haploxylon zuzuteilen.

KUNG-TSUNG WANG, K. C. DAS,
YU-YIN LIN and B. WEINSTEIN

Department of Chemistry, National Taiwan University,
Taipei (Taiwan, Republic of China), and
Department of Chemistry, University of Washington,
Seattle (Washington 98105, USA), 23 March 1970.

¹ N. T. MIROV, *Composition of Gum Turpentine of Trees* (Technical Bulletin 1239, Forest Service, United States Department of Agriculture, Washington 1967), p. 27.

² G. LINDSTEDT, *Acta chem. scand.* 5, 129 (1951).

³ H. ERDTMAN, *Pure appl. Chem.* 6, 679 (1963).

⁴ H. ERDTMAN, B. KIMLAND and T. NORIN, *Bot. Mag., Tokyo* 79, 499 (1966).

⁵ R. HEGNAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen* (Birkhäuser, Basel 1962), vol. 1.

⁶ Our thanks are due to Mr. D. F. ZINKEL, Forest Products Laboratory, United States Department of Agriculture, Madison (Wisconsin) and Prof. H. ERDTMAN, Royal Institute of Technology, Stockholm (Sweden) for reference compounds.

⁷ G. LINDSTEDT and A. MISIORNY, *Acta chem. scand.* 5, 121 (1951).

⁸ *P. formosana* was not examined by LINDSTEDT (reference²), but the specific phenolic content of this pine was noted in a table by ERDTMAN (references³ and⁴).

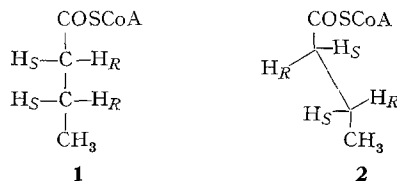
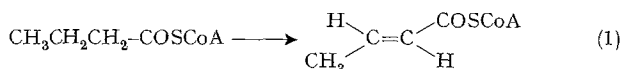
⁹ A. PEITER, P. STANTON and M. BARBER, *J. hetero. Chem.* 2, 262 (1965).

¹⁰ H. AUDIER, *Bull. Soc. Chim. France* (1966), 2892.

¹¹ J. W. CLARK-LEWIS, *Aust. J. Chem.* 21, 3025 (1968).

Zur Stereochemie der enzymatischen Dehydrierung von Butyryl-CoA

Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Butyryl-CoA: (Akzeptor) Oxydoreduktase E.C.1.3.2.1), ein FAD enthaltendes mitochondriales Enzym des Fettsäureabbaus, katalysiert die Dehydrierung von Butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA¹ (Gl. 1). In vivo ist dieser Oxydationsprozess mit dem Elektronentransportsystem der Atmungskette verbunden; in vitro können auch künstliche Akzeptoren, wie Dichlorophenol-indophenol, Methylenblau oder Kaliumhexacyanoferrat(III) die Elektronen aufnehmen, dies geschieht aber nur dann in ausreichendem Masse, wenn geeignete Mediatoren, wie ein Elektronen transportierendes Protein oder Phenazinmethosulfat, zugegen sind. Im Zusammenhang mit Arbeiten über die mechanistisch ähnliche enzymatische Umwandlung von Bernsteinsäure in Fumarsäure² drängte sich eine genaue stereochemische Untersuchung der Reaktion auf. Nachfolgend wird über die Resultate einer solchen Untersuchung berichtet.



Die beiden Methylengruppen des Butyryl-Restes, die in die Reaktion direkt einbezogen werden, sind prochiral³ und tragen je ein pro-*R*- und ein pro-*S*-Wasserstoffatom (vgl. **1** und **2**). Zur Feststellung der Identität der zur Abspaltung gelangenden H-Atome war es notwendig, an C-2 bzw. C-3 stereospezifisch tritierte Butter-

säure-Proben herzustellen. Die eingeschlagenen Synthesewege sind im Schema 1 zusammengefasst.

Enzymatische Reduktion von [$1\text{-}^3\text{H}$]-Propionaldehyd **3** mit NADH in Gegenwart von Hefe-ADH gab (*1S*)-[$1\text{-}^3\text{H}_1$]-Propan-1-ol **4**, dessen Tosylat **5** bei der mit Inversion stattfindenden Cyanolyse^{4,5} (*2R*)-[$2\text{-}^3\text{H}_1$]-Butyronitril **6** lieferte. Hydrolyse der Nitrilgruppe von **6** erfolgte über das entsprechende Amid in Anlehnung an eine früher erprobte Methode⁴, und führte praktisch ohne Tritiumverlust zu (*2R*)-[$2\text{-}^3\text{H}_1$]-Buttersäure, **7**. Die dazu enantiomere (*2S*)-[$2\text{-}^3\text{H}_1$]-Buttersäure **9** stellte man auf ähnlichem Wege ausgehend von (*1R*)-[$1\text{-}^3\text{H}_1$]-Propyltosylat **8** dar, das seinerseits durch $\text{S}_{\text{N}}2$ -Solvolysen von **5** mit 2*N* NaOH⁶ und nochmaliger Tosylierung zugänglich war. Die vorgenommene Zuordnung der Konfiguration für die Säuren **7** und **9** beruht im wesentlichen auf der wohlbegründeten Annahme, dass die enzymatische Reduktion von Propionaldehyd sterisch gleich derjenigen von Acetaldehyd abläuft^{7,8}. Dass diese Annahme zutrifft, wurde durch

¹ H. BEINERT, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN), 5, 546 (1962).

² J. RÉTEY, J. SEIBL, D. ARIGONI, J. W. CORNFORTH, G. RYBACK, W. P. ZEYLEMAKER und C. VEEGER, *Eur. J. Biochem.*, 14, 232 (1970).

³ K. R. HANSON, *J. Am. chem. Soc.* 88, 2731 (1966).

⁴ D. ARIGONI, F. LYNEN und J. RÉTEY, *Helv. chim. Acta* 49, 311 (1966).

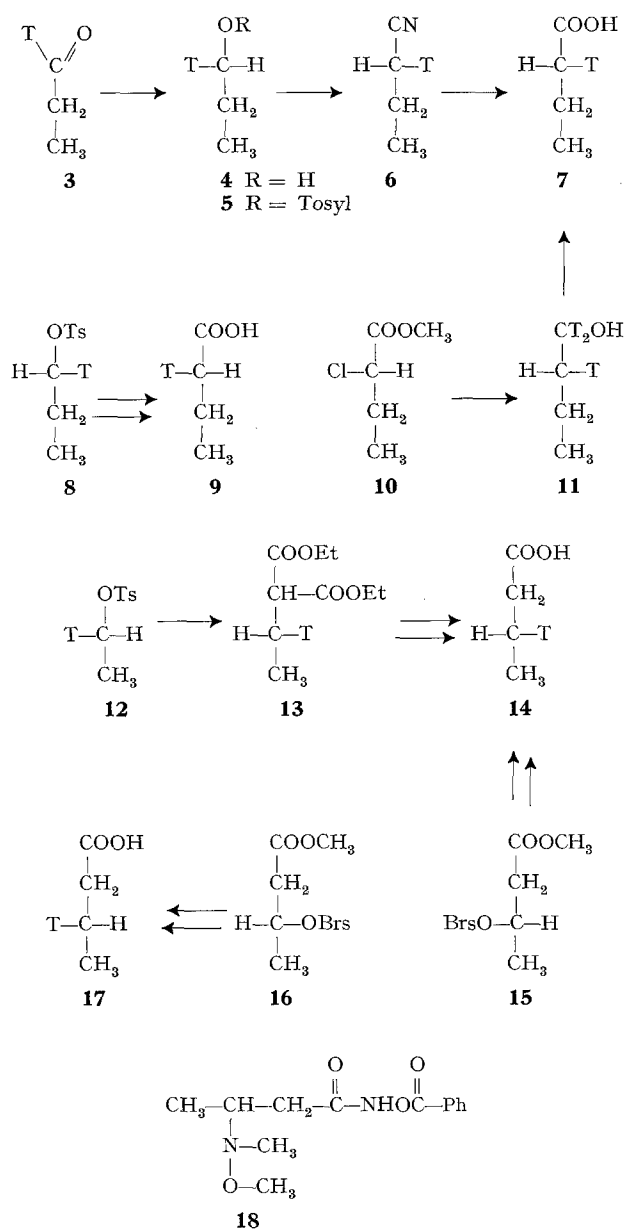
⁵ B. ZAGALAK, P. A. FREY, G. L. KARABATSOS und R. H. ABELES, *J. biol. Chem.* 241, 3028 (1966).

⁶ F. A. LOEWUS, F. H. WESTHEIMER und B. VENNESLAND, *J. Am. chem. Soc.* 75, 5018 (1953).

⁷ R. U. LEMIEUX und J. HOWARD, *Can. J. Chem.* 41, 308 (1963).

⁸ H. WEBER, J. SEIBL und D. ARIGONI, *Helv. chim. Acta* 49, 741 (1966).

Schema 1



eine unabhängige Synthese von **7** bewiesen. Die mit Inversion ablaufende Reduktion von (2S)-2-Chlorbuttersäure-methylester **10** mit [³H]-LiAlH₄ und anschließende Oxydation des tritierten Butan-1-ols **11** mit Sauerstoff und Pt als Katalysator⁹ gab eine 2-Tritiobuttersäure, welche sich in dem unten beschriebenen enzymatischen Test in qualitativer Hinsicht wie (2R)-[2-³H₁]-Buttersäure **7** verhielt.

(3R)-[3-³H₁]-Buttersäure **14** stellte man ausgehend von (1S)-[1-³H₁]-Äthyltosylat **12** her, welches mit dem Anion von Malonsäurediäthylester unter Inversion der Konfiguration zu **13** umgesetzt wurde, woraus die gewünschte Verbindung **14** durch Hydrolyse und Decarboxylierung gewonnen werden konnte. Die gleiche Verbindung liess sich im übrigen aus dem Brosylat **15** von (3S)-3-Hydroxybuttersäuremethylester^{10,11} durch Reduktion mit [³H]-LiAlH₄ zum Butanol, gefolgt von Oxydation mit O₂ und Pt als Katalysator, herstellen. Derselbe Weg wurde ausgehend von dem Brosylester **16** für die Herstellung von (3S)-[3-³H₁]-Buttersäure **17** eingeschlagen. Die unter Verwendung von LiAlD₄ bereiteten Deuterium-Analoga von **14** und **17** konnten anhand ihrer ORD-Kurven charakterisiert werden, wobei das (R)-Isomere die Werte [α]₂₆₀ = +5,2°, [α]₂₅₀ = +7,0°, [α]₂₄₀ = +10,5°, [α]₂₃₀ = +15,7°, das (S)-Isomere die Werte [α]₂₆₀ = -5,6°, [α]₂₅₀ = -7,2°, [α]₂₄₀ = -11,0° aufwies.

Die so hergestellten Buttersäuren **7**, **9**, **14** und **17** wurden nach Zugabe von [1-¹⁴C]-Buttersäure als interner Standard in ihre Coenzym-A-Derivate übergeführt¹² und mit Hilfe eines hochgereinigten Präparates von Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus Schweineleber¹³ zu Crotonyl-CoA oxydiert (Umsatz 60–80%). Das Reaktionsgemisch wurde mit einem Überschuss des Thioesters aus Crotonsäure und N-Acetylcysteamin versetzt und das Produkt als 3-(N, o-Dimethylhydroxylamino)-butyrylhydroxamsäurebenzoyl ester **18** isoliert und gereinigt. Die Resultate der Radioaktivitätsmessungen von typischen Experimenten sind aus der Tabelle ersichtlich.

⁹ Unter ähnlichen Bedingungen entsteht aus (S)-Chlorobernsteinsäure mit LiAlD₄ optisch reine (R)-[2-³H₁]-Bernsteinsäure (F. Kunz, Dissertation ETH Prom. Nr. 4519).

¹⁰ R. U. LEMIEUX und J. GIGUERE, Can. J. chem. 29, 678 (1951).

¹¹ A. L. LEHNINGER und G. D. GREVILLE, Biochim. biophys. Acta 12, 188 (1953).

¹² Zur Methodik vergleiche TH. WIELAND und L. RUEFF, Angew. Chem. 65, 186 (1953).

¹³ L. BÜCKLERS, unveröffentlicht.

Experiment Nr.	Markierte Buttersäuren	Konzentration im Reaktionsgemisch		Isotopenverhältnis (³ H/ ¹⁴ C)		³ H-Verlust (%)
		Bu-CoA μM/ml	DCPIP μM/ml	Edukt ^a	Produkt ^b	
1	(2R)-[2- ³ H ₁]-, 7 aus 4	0,71	1,45	2,67 ± 0,03	0,015 ± 0,012	99,4 ± 3,4
2	(2R)-[2- ³ H ₁]-, 7 aus 10	0,65	1,2	4,44 ± 0,04	1,19 ± 0,01	73,2 ± 2
3	(2S)-[2- ³ H ₁]-, 9 aus 8	0,71	1,45	4,10 ± 0,07	4,07 ± 0,13	0,7 ± 3,5
4	(3R)-[3- ³ H ₁]-, 14 aus 15	0,4	5,5	4,10 ± 0,1	0,81 ± 0,001	80,2 ± 2,5
5	(3R)-[3- ³ H ₁]-, 14 aus 15	1,0	2,3	1,36 ± 0,01	0,208 ± 0,004	84,7 ± 2
6	(3R)-[3- ³ H ₁]-, 14 aus 12	1,15	1,25	1,68 ± 0,02	0,373 ± 0,006	77,8 ± 5
7	(3S)-[3- ³ H ₁]-, 17 aus 16	0,5	5,5	6,9 ± 0,15	5,95 ± 0,1	14,0 ± 2,4

Ein typischer Reaktionsansatz enthält: 1–2 Einheiten Butyryl-CoA-Dehydrogenase; 1 mg FAD; 3 mg Phenazinmethosulfat; 1000 μM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,9; für die Konzentrationen von Butyryl-CoA (Bu-CoA) und Dichlorophenol-indophenol (DCPIP) vergleiche Tabelle. Totalvolumen des Reaktionsgemisches 10 ml; Reaktionstemperatur 28–30°C; Reaktionsdauer bis zur Zugabe von N, O-Dimethylhydroxylamin 40 min. ^a Gemessen als Hydroxamsäurebenzoyl ester. ^b Gemessen als 3-(N, o-Dimethylhydroxylamino)-butyrylhydroxamsäurebenzoyl ester **18**.

Aus diesen Werten geht hervor, dass im Laufe der Dehydrierung sowohl aus C-2 als auch aus C-3 des Eduktes spezifisch das H_R -Atom abgespalten wird, entsprechend einer *trans*-Abspaltung von H-Atomen aus jener anti-periplanaren Konformation des Substrates (vergleiche **2**), welche der fixierten *trans*-Anordnung des Produktes topologisch am nächsten steht. Die Verhältnisse sind besonders klar bei den Tritiobuttersäuren **7** und **9**, welche aus enzymatisch dargestellten chiralen $[1-^3H]$ -Propanolen erhalten worden waren und die bei der Oxydation entweder alles oder kein Tritium verloren (Experiment Nr. 1 und 3). Retention bzw. Verlust von Tritium sind hingegen nicht so vollständig bei der Oxydation von Verbindungen **14** und **17** (Experiment Nr. 4, 5, 6 und 7). Der Grund dafür dürfte eher in der geringeren sterischen Reinheit der Substrate als in einer mangelnden Stereospezifität des Enzyms zu suchen sein. Hinsichtlich des sterischen Verlaufs der Reaktion bestehen somit für den hier untersuchten Vorgang ähnliche Verhältnisse wie bei der enzymatischen Dehydrierung von Bernsteinsäure².

Übereinstimmende Resultate sind inzwischen in unabhängigen Untersuchungen mit dem gleichen Enzym von DRYSDALE¹⁴ erzielt worden. In die gleiche Richtung weisen ferner die Experimente von SIMON et al.¹⁵ über

die Bildung von Buttersäure in *Clostridium tyrobutyricum*¹⁵ und in *Clostridium kluyveri*¹⁶.

Summary. The stereochemistry of the formation of crotonyl CoA from butyryl CoA catalyzed by the appropriate pig liver enzyme was investigated using samples of butyric acid specifically labelled with tritium in the two methylene groups. It is shown that oxidation involves specific removal of the pro-R hydrogen atoms from positions 2 and 3 of the substrate.

L. BÜCKLERS, A. UMANI-RONCHI,
J. RÉTEY und D. ARIGONI

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule,
CH-8006 Zürich (Schweiz), 21. Mai 1970.

¹⁴ G. R. DRYSDALE, J. biol. Chem. (eingereicht zur Veröffentlichung).

¹⁵ H. SIMON, S. K. ERICKSON und A. BOPP, Z. Naturforsch. **21b**, 1115 (1966).

¹⁶ H. SIMON, Chimia **24**, 114 (1970).

Demethylcephaeline, a New Alkaloid from *Alangium lamarckii*. Characterization of AL 60, the Hypotensive Principle from the Stem-Bark

A number of alkaloids possessing isoquinoline and its hybrid structures with β -carboline have been isolated from the seeds¹, roots², leaves³ and fruits⁴ of *Alangium lamarckii* Thw. (Alangiaceae). We report the isolation of yet another new alkaloid and characterization of an amorphous drug, designated as AL 60, from the stem-bark of the same plant. The latter, showing a low toxicity and insignificant side effects⁵, was found to exert interesting biphasic action on blood pressure of cats injected i.v. under either chloralose-urethane or sodium nembutal anaesthesia. The actions were dose-dependent, sustained and prolonged.

The total crude alkaloid mixture from the stem-bark was chromatographed over silica gel. Elution with chloroform containing increasing proportions (0.5–10%) of methanol yielded cephaeline, $[\alpha]_D - 39.6^\circ$ ($CHCl_3$), characterized as hydrochloride, mp 254–257°, $[\alpha]_D + 21^\circ$ (H_2O); psychotrine, mp 121–123°, $[\alpha]_D + 80.2^\circ$ (MeOH), M^+ at m/e 464, dihydrogen oxalate, mp 131–145°, $[\alpha]_D + 21.6^\circ$ (H_2O); tubulosine, mp 257°, $[\alpha]_D - 73.0^\circ$ (C_5H_5N); desmethylpsychotrine², mp 165–167°, $[\alpha]_D + 72.3^\circ$ (MeOH) and a new amorphous base, mp 147–149°, $[\alpha]_D - 53.5^\circ$ ($CHCl_3$). The last one was eluted with 5% methanol in chloroform and purified through preparative TLC on silica gel using a mixture of benzene-ethyl acetate-diethylamine (2:2:1) as the developing solvent.

The new base formed a hydrochloride, mp 262–265° (dec.) $[\alpha]_D + 19.8^\circ$ (H_2O). On treatment with diazomethane and following the conversion by TLC, it was observed that the compound formed cephaeline (Ic) within 5 min, while emetine (Id), which could be detected after 1 h, was the major product after 24 h. The mass spectrum⁶ of the alkaloid exhibited molecular ion at m/e 452 corresponding to the molecular formula $C_{27}H_{36}N_2O_4$ and the base peak at m/e 178. The fragmentation pattern was found to be exactly parallel to that of cephaeline, except that the ion peaks corresponding to the A/B/C ring system were

shifted to lower values by 14 mass units (at m/e 274, 272, 260, 259, 258, 232, 230, 192 and 191). The compound could thus be inferred to be a ring A monodemethylated cephaeline.

Its IR-spectrum in Nujol exhibited a broad peak of medium intensity between 9.7–9.9 μ as against two sharp ones in that of cephaeline in the same region, for $=C-O-C$ symmetrical stretching vibration, similar to the observed difference between the spectra of desmethylpsychotrine and psychotrine.

The UV-absorptions of the compound, λ_{max} (log ϵ) at 211 (4.28), 225 s (3.91) and 286 (3.69) nm in ethanol and at 213 s (3.48), 227 (3.96), 247 (4.05) and 301 (3.81) nm in 0.1 N alcohol. NaOH were very close to those of cephaeline with the difference that the bathochromic shift of the peak at 285 nm in alkaline medium was complete only in the former. This observation is compatible with the presence of a phenolic hydroxy group also in ring A of the new base, though it did not permit a discrimination between its location either at position 6 or 7. The compound was, however, found to be identical (IR) with the major product obtained by demethylation of cephae-

¹ H. BUDZIKIEWICZ, S. C. PAKRASHI and H. VORBRUEGGEN, Tetrahedron **20**, 399 (1964). – S. C. PAKRASHI and E. ALI, Ind. J. Chem. **7**, 635 (1969).

² S. C. PAKRASHI and E. ALI, Tetrahedron Letters **1967**, 2143, for leading references.

³ A. R. BATTERSBY, R. S. KAPIL, D. S. BHAKUNI, S. P. POPLI, J. R. MERCHANT and S. S. SALGAR, Tetrahedron Letters **1966**, 4965.

⁴ A. R. BATTERSBY, J. R. MERCHANT, E. A. RUVEDA and S. S. SALGAR, Chem. Commun. **1965**, 315.

⁵ A. K. DUTTA and S. C. PAKRASHI, Ann. Biochem. exp. Med., India **22**, 129 (1962).

⁶ The authors are indebted to Dr. B. C. DAS of Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, France, for the spectrum.