

ZUR KONFORMATION VON FRANGULANIN

UNTERSUCHUNG MIT HILFE DER ^{13}C - UND ^1H -NMR-SPEKTROSKOPIE

E. HASLINGER*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien, Währinger Strasse 38, A-1090 Wien, Austria

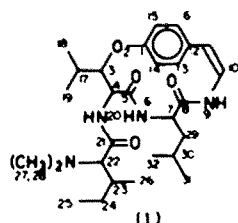
(Received in Germany 22 April 1977; Received in the UK for publication 20 September 1977)

Zusammenfassung—Aus den Ergebnissen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie lässt sich ableiten, dass Frangulanin (I) in CDCl_3 eine Wasserstoffbrückenbindung in Form eines γ -loops zwischen der Isoleucinseitenkette und dem $\text{NH}(6)$ des 14-gliedrigen Ringes besitzt. Durch Zusatz von CD_3OD wird diese Brückenbindung geöffnet und es kommt zur Entfaltung der Seitenkette. Auswirkungen dieses Vorganges auf die Konformation des 14-gliedrigen Ringes können beobachtet werden.

Abstract—From the ^{13}C -NMR-Spectrum of Frangulanin (I) and ^1H NMR-measurements solvent induced conformational changes can be observed.

Einleitung

Peptidalkaloide vom Pandamintyp sind im letzten Jahrzehnt in zunehmenden Masse als Inhaltsstoffe einiger Pflanzenfamilien festgestellt worden.^{1,2} Obwohl ^1H -NMR-Spektren dieser Alkaloide mehrfach beschrieben wurden und wichtige Aussagen über die Konfiguration erlaubten, gibt es über die Konformation derartiger Moleküle in Lösung fast keine Angaben.^{3,4} Ausserdem erscheint der Versuch aussichtsreich mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie etwas mehr Einblick in die sterischen Verhältnisse solcher macrocyclischer Verbindungen zu erhalten. Insbesondere hat sich gezeigt, dass die chemische Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum für Konformationsänderungen recht empfindlich ist.^{17-22,36} Frangulanin (I) wurde erstmals von Tschesche *et al.*⁵ aus *Rhamnus frangula* L. isoliert und ist inzwischen auch in verschiedenen anderen Rhamnaceen nachgewiesen worden.⁶⁻¹⁰



(I)

*Die Messung des NOE-Effektes erlaubt nicht nur eine stereochemisch eindeutige Zuordnung der Signale zu den diastereotopen Methylgruppen C-18) und C-19), sondern gestattet es, die Konfiguration der β -Hydroxyleucineinheit im Molekül abzuleiten. Nur wenn diese erythro-Konfiguration besitzt, ist bei synclinaler Anordnung von H an C-3) und H an C-17) ($J_{\text{H}(3),\text{H}(17)}$, = 2.3 Hz) ein Kernoverhauser-Effekt von beiden Methylgruppen zu je einem dieser Protonen zu erwarten. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem Befund von Wenkert *et al.*,² die auf Grund spektroskopischer Messungen und durch chemischen Abbau die ursprünglich angenommene threo-Konfiguration berichtigten. Zur Nomenklatur vergl. 11-16.

†Im Gegensatz dazu beschreibt Warnhoff,¹ dass $\text{NH}(9)$ dem langsamsten Austausch unterliegt (Vergl. auch 3).

^1H -NMR-Spektroskopische Messungen

Es wurden Spektren in CDCl_3 , CDCl_3 + 10 Vol.-% CD_3OD und d_6 -DMSO aufgenommen. Tabelle 1 enthält die chemischen Verschiebungen, Signalmultiplizitäten und Kopplungskonstanten soweit sie den Spektren entnommen werden konnten. In CDCl_3 erscheinen die Signale der Protonen an C-3), C-4), C-7) und C-22) im Bereich von $\delta = 2.5$ ppm bis $\delta = 5$ ppm: deutlich abgesetzt und sind durch ihr charakteristisches Aufspaltungsmuster leicht zuzuordnen. H an C-17) konnte durch ein INDOR-Experiment von H an C-3) bei $\delta = 2.05$ ppm gefunden werden und durch weitere Doppelresonanzexperimente wurden CH_3 -18) und CH_3 -19) lokalisiert. Diese beiden diastereotopen Methylgruppen besitzen deutlich verschiedene Resonanzfrequenzen. Durch NOE-Messung an den Signalen von H an C-3) und H an C-4) konnte entschieden werden, welche Signale vom pro-R- und welche vom pro-S-Liganden herrühren† (Tabelle 2).

Die Amid-Protonen sind mit D_2O verschieden rasch austauschbar. Die Austauschgeschwindigkeiten in CDCl_3 -Lösung können qualitativ wie folgt dargestellt werden:

NH Zeit bis zum Verschwinden des entsprechenden Kernresonanzsignals‡

- 6 auch nach einstündigen Erwärmen auf 45°C nicht austauschbar
- 9 15-20 Min.
- 20 sofort
- CD_3OD -Zusatz bewirkt sofort raschen H-D-Austausch bei allen Amid-gruppen.

^{13}C -NMR-Spektroskopische Messungen

^{13}C -Kernresonanzspektren wurden in CDCl_3 , CDCl_3 + 10 Vol.-% CD_3OD und CDCl_3 + 30 Vol.-% CD_3OD als Lösungsmittel aufgenommen (Tabelle 3). Es wurden breitbandentkoppelte und offresonanzentkoppelte Spektren aufgenommen. Die Zuordnung der Signale wurde durch Vergleich mit Daten von Referenzverbindungen¹⁸⁻²¹ und durch eine Reihe von selektiven Entkop-

Tabelle 1. ¹H Kernresonanzspektren von (I)

H an C-X	δ (ppm)	CDCl ₃	J (Hz)	CDCl ₃ + 10% CD ₃ OD	δ (ppm)	J (Hz)	d ₆ -DMSO 35°	δ (ppm)	J (Hz)	d ₆ -DMSO 80°†	δ (ppm)	J (Hz)
3	4.95	dd	7.5 2.3	4.83	dd	8.0 2.0	4.76	dd	8.4 1.5	4.75	dd	8.0 2.0
4	4.49	dd	7.5 10.0	4.42	d	8.0	4.42	dd	8.4 9.2	4.40	dd	9.0 8.0
7	4.02	m	4.5 7.0 9.0	3.98	m	6.5† 8.0	3.92	m		3.90	dt	8.0 7.0
10	6.43	m§	7.1	6.28	d	7.2‡	6.20	dd	7.0 6.0	6.22	dd	8.0 7.0
11	6.57	d§	7.1	6.61	d	7.2‡	6.56	d	7.0	6.48	d	8.0
13-16	ca. 7.1	m		7.01	m		6.97	m				
17	2.05	m	2.1 6.5	2.09	m	2.0† 6.5						
18 (pro R)	1.26	d	6.5	1.21	d	6.5	1.12	d	6.3	1.12	d	7.0
19 (pro S)	1.01	d	6.5	0.98	d	6.5	0.94	d	6.3	0.94	d	7.0
22	2.67	d	3.6	2.58	d	6.0	2.70	d	10.0	2.68	d	10.0
23				1.80	m	5.75 6.5‡						
24				1.21 1.53	m	7.2‡						
25	0.92	t	6.0	0.91	t	7.2‡	0.78	t	~6.0	0.71	t	7.0
26	0.91	d	~6.0	0.85	d	6.5‡	~0.74	d	~6.0	0.72	d	7.0
27, 28	2.19	s		2.20	s		2.23	s		2.22		
29				1.21 1.53	m	6.5 8.0‡						
30				1.40	m	6.2 6.5‡						
31	0.81	d	~6.0	0.81	d	6.5‡	0.74	d	~6.0	0.82	d	7.0
32	0.75	d	6.0	0.76	d	6.2	0.66	d	~6.0	0.67	d	7.0

† Aus Lit. 3.

‡ Diese Daten sind einem 270 MHz FT-Spektrum entnommen.

§ Signalüberlagerung mit Amid-NH.

¶ Die eindeutige Zuordnung der Signale wurde durch Eliminierung der kleinen Fernkopplung von H an C-(11) mit den Aromatenprotonen getroffen.

Tabelle 2. Ergebnisse der NOE-Messungen

Störfeld bei (ppm)	% NOE gemessen bei Signal von H-(3)	H-(4)
1.21	11 ± 0.8	4 ± 0.8
0.98	4 ± 0.8	12 ± 0.8

Tabelle 3. ¹³C-Kernresonanzspektren von (I)

C	CDCl ₃ , CDCl ₃ δ (ppm)	CDCl ₃ + 10 Vol.-% CD ₃ OD δ (ppm)	CDCl ₃ + 30 Vol.-% CD ₃ OD δ (ppm)	$\Delta\delta$ †
1	156.2	156.5	156.7	0.5
3	81.6	81.5	81.3	0.3
4	55.4	55.6	55.8	-0.4
5	171.5	171.8	171.9	-0.4
7	52.7	52.4	52.4	0.3
8	168.0	169.5‡	170.5	-2.5
10†	131.2	130.9	130.7	0.8
11†	130.2	130.0	129.9	0.3
12	131.8	131.4	131.3	0.5
13	122.7	123.8‡	127.2	-4.5
14	117.9	119.6	118.7	-0.8
15	122.0	121.9	121.6	0.4
16	125.9	125.9	126.0	-0.1
17	29.2	29.2	29.3	-0.1
18§	20.3	20.4	20.4	-0.1
19§	15.1	14.9	15.1	0
21	172.4	172.2	172.2	0.2
22	73.0	73.7	74.0	-1.0
23	33.9	34.2	34.5	-0.6
24	28.4	27.5	27.0	1.4
25	12.3	12.0	11.7	0.6
26	15.3	15.1	14.9	0.4
27, 28	43.0	42.8	42.6	0.4
29	40.2	40.8	41.4	-1.2
30	24.5	24.6	24.7	-0.2
31‡	22.9	22.7	22.7	0.2
32‡	21.6	22.0	22.3	-0.7

† $\Delta\delta = (\delta_{\text{CDCl}_3} - \delta_{\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol.-% CD}_3\text{OD}})$.

‡ Etwas verbreitert.

§ Zuordnung unsicher.

¶ 18 = pro R, 19 = pro S.

‡ Keine Topizitätszuordnung möglich.

plungsexperimenten getroffen. So wurde die Zuordnung der Signale zu den C-Atomen (3), (4), (7) und (22) durch selektive Entkopplung der entsprechenden Protonen getroffen. Auf dem gleichen Weg gelang es die Signale bei $\delta = 20.3$ ppm und $\delta = 15.1$ ppm der pro-R- bzw. pro-S-Methylgruppe der β -Hydroxyleucineinheit zuzuordnen. Im unentkoppelten ¹³C-Kernresonanzspektrum von Aminosäuren findet man Kopplungen des Carbonylkohlenstoffes mit den H-Atomen in α und β -Stellung. In allen Fällen ist die ³J_{CO-H} (ca. 5–7 Hz) grösser als die ¹J_{CO-H} (2–4 Hz).^{21,24} Durch selektive Entkopplung vom entsprechenden H ist es möglich, die drei Carbonylresonanzen den einzelnen Aminosäureresten zuzuordnen.†

Die Signale der aromatischen Kohlenstoffatome (13) bis (16) lassen sich in zwei Gruppen teilen: je zwei dieser Signale zeigen praktisch keinen Solvenseinfluss—während die chemische Verschiebung der beiden anderen deutlich variiert (Abb. 1). Letztere müssen also jenen C-Atomen zugeordnet werden, die sterischen Wechselwirkungen mit dem relative starren 14-gliedrigen Ringsystem unterliegen. Innerhalb dieser beiden Gruppen kann durch Abschätzung des Substituenteneinflusses die vollständige Zuordnung getroffen werden.

Diskussion

¹H-NMR-Spektren. Der Wasserstoff der (6)-Amidgruppe ist in CDCl₃ nicht mit D₂O austauschbar.

† Alle Amidprotonen waren durch ³H ersetzt.

Frangulanin liegt also in diesem Lösungsmittel in einer Konformation vor, in der dieser Amidwasserstoff vom Lösungsmittel abgeschirmt ist. Eine solche kann durch

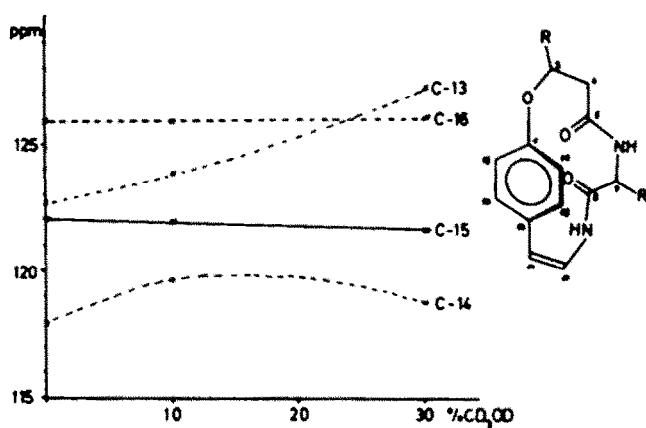


Abb. 1.

Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung von NH-(6) mit dem Sauerstoff CO (21) erreicht werden.[†] Derartige Ringbildungen sind in der Peptidchemie als γ -loop bekannt und treten unter anderem in cyclischen Peptiden auf.²⁴ Durch Zusatz von CD₃OD oder in DMSO-*d*₆ wird diese Bindung aufgehoben und rascher H-D-Austausch ermöglicht.[‡] Diese Konformationsänderung kann auch an der solvensabhängigen Kopplung $^3J_{H(22)-H(23)}$ erkannt werden. Bei geschlossenem γ -loop nehmen diese beiden Protonen eine synclinale Anordnung ein, während nach Öffnen der Wasserstoffbrücke antiperiplanare Anordnung vorherrscht. Auswirkungen der γ -loop-Bildung auf den 14-gliedrigen Ring können an den vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{NH-CH}$ ^{27,28,29} (Tabelle 4) erkannt werden.

Tabelle 4. Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der NH-Protonen von (I)

NH in Posi- tion	CDCl ₃			<i>d</i> ₆ -DMSO			$\Delta\delta$
	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	α^\dagger	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	α^\dagger	
6	5.93	7.0	20°	7.22	8.0	0°	-1.29
9	6.4	6.4	25°	7.52	6.0	30°	-1.1
20	7.38	10.0	0°	8.16	9.2	5-10°	-0.78

[†]Winkel abgeschätzt aus der vicinalen Kopplungskonstanten, (vergl. Lit. 27, 28).

$\Delta\delta = (\delta_{CDCl_3} - \delta_{d_6 DMSO})$.

Ergebnisse der ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, ist der Solvenseinfluss auf die chemische Verschiebung der C-Atome in Frangulanin recht unterschiedlich. Während bei den meisten C-Atomen die $\Delta\delta$ -Werte kleiner oder gleich 0.5 ppm sind, treten bei einzelnen C-Atomen höhere Werte auf. Dies gilt auch für die Carbonylgruppen bei denen lediglich C-(8) mit einem $\Delta\delta$ -Wert von -2.5 ppm auffällt. Dieser Unterschied kann keinesfalls von Wasserstoffbrückenbindung zum *d*₆-methanol herrühren. Änderungen der chemischen Verschiebung von Carbonylgruppen durch Wasserstoffbrückenbindung sind für das System

CHCl₃/CH₃OH gemessen worden.³⁰ Die Verschiebungsdifferenzen sind mit Ausnahme von Aceton kleiner als 0.4 ppm und werden für höhersubstituierte Carbonylverbindungen noch kleiner. Auch einige der anderen $\Delta\delta$ -Werte erscheinen in diesem Zusammenhang etwas hoch, zumal manche der zugehörigen C-Atome durch ihre chemische Natur kaum Wasserstoffbrückenbindung eingehen können. Der $\Delta\delta$ -Wert von C-(29) (-1.2 ppm) ist offenbar Ausdruck dafür, dass dieses C-Atom in CDCl₃-Lösung bei bestehender Wasserstoffbrückenbindung mit der Isoleucinseitenkette sterischen Wechselwirkungen unterliegt. Die daraus resultierende Hochfeldverschiebung fällt mit Zusatz von CD₃OD weg. Sterische Beiträge dieser Art zur chemischen Verschiebung sind meist klein und können bei derlei Vorzeichen besitzen.³⁵⁻³⁷

Der schon in der 1H -NMR-Spektroskopie erkennbare Einfluss der Seitenkettenentfaltung auf den 14-gliedrigen Ring ist im ^{13}C -Spektrum besonders deutlich bemerkbar. Bei geschlossener Brücke kommen sich C-(13) und die Carbonylgruppe C-(8) besonders nahe. Wird durch CD₃OD-Zusatz die Konformation geändert, so kann der grosse Ring sterischen Spannungen etwas mehr nachgeben. Dies äussert sich in der besonders starken Verschiebung der Resonanzfrequenzen von C-(13), C-(14) und C-(8) zu tieferem Feld.

EXPERIMENTALTEIL

Die 100 MHz 1H -Spektren und alle ^{13}C -Spektren wurden auf einem Varian XL-100-15 Puls-Fourier-Transformations-Kernresonanzspektrometer gemessen. Im FT-mode war dieses Gerät mit einem 16k 620-L-100 Computer kombiniert. Bei fast allen Messungen wurden 12 mm ϕ Messröhrchen verwendet. Die Konzentration der Messlösung in CDCl₃ war 0.08 mol/l., in CDCl₃ + 10% CD₃OD und CDCl₃ + 30% CD₃OD 0.13 mol/l. und in *d*₆-DMSO 0.1 molar. TMS wurde als interner Standard in einer Konzentration von jeweils ca. 6-8% verwendet. Alle 1H -Spektren und 1H - ^{13}C Doppelresonanzexperimente wurden im CW-mode durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in allen Fällen genauer als ± 0.2 ppm, während die Genauigkeit der Kopplungskonstanten, sofern nicht anderes angezeigt, ± 0.2 Hz beträgt.

Die Frequenzbestimmung bei den selectiven 1H - ^{13}C -Entkopplungsexperimenten erfolgte einmal durch direkte Frequenzmessung im 1H -Spektrum und zum anderen durch Berechnung aus dem 1H -F.T.-Observe Offset des XL-100. Beide Bestimmungen lieferten Werte mit höchstens ± 0.6 Hz Differenz.

Zur Messung des Kern-Overhausereffektes wurde eine 0.13 molare Lösung von Frangulanin in CDCl₃ + 30% CD₃OD im 12 mm Röhrchen durch Durchleiten von Argon von Sauerstoff

[†]Messungen der Temperaturkoeffizienten der chemischen Verschiebung der Amidprotonen in CDCl₃ sind beschrieben worden,^{3,25} brachten aber kein eindeutiges Ergebnis.

[‡]Ähnliches ist auch in *d*₆-DMSO-Lösung für das analog gebaute Alkaloid Discarin B beschrieben worden.³ Zusatz von 1% Trifluoressigsäure bewirkt dort sofortigen Austausch.

befreit. Die Deuteriumresonanz der Methylgruppe von CD_3OD diente als Feld-Frequenz-Locksignal. Die angegebenen Werte sind aus jeweils 15 Messungen nach der üblichen Messtechnik^{27,28} durch Mittelwertbildung erhalten worden.

Die Isolierung und Reinigung von Frangulanin ist an anderer Stelle beschrieben worden.³¹

Danksagung—Herrn Dr. J. Leitich, Max-Planck-Institut für Kohleforschung in Mülheim a.d. Ruhr sei für die Aufnahme des 270 MHz- ^1H -FT-Spektrums herzlich gedankt. Dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung wird für die Bereitstellung des Varian XL-100-15 Puls-Fourier-Spektrometers und einer Kassettenbandeinheit zur Datenspeicherung gedankt.

LITERATUR

- ¹E. W. Warnhoff, *Peptide Alkaloids in Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe* **28**, 163 (1970).
- ²M. González Sierra, O. A. Mascaretti, F. J. Diaz, E. A. Róveda, Ching-Jer Chang, E. W. Hagermann und E. Wenkert, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 915 (1972).
- ³Ching-Jer Chang, E. W. Hagermann, E. Wenkert, M. González Sierra, O. A. Mascaretti, V. M. Méruza und E. A. Róveda, *Phytochemistry* **13**, 1273-9 (1974); vergl. auch: M. Takai, Ken-ichi Kawai, Yukio Ogihara, Yoichi Iitaka und Shoyi Shibata, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 653 (1974).
- ⁴M. Takai, Y. Ogihara, Y. Iitaka und S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 2556-2559 (1975).
- ⁵R. Tschesche, H. Last und H.-W. Fehlhaber, *Chem. Ber.* **100**, 3937-3943 (1967).
- ⁶R. Tschesche, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 5619 (1969).
- ⁷D. W. Bishay, Z. Kowalewski und J. D. Phillipson, *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 169 (1972).
- ⁸D. W. Bishay, Z. Kowalewski und J. D. Phillipson, *Phytochemistry*, **12**, 693-696 (1973).
- ⁹T. Makato, Y. Ogihara und S. Shibata, *Phytochemistry* **12**, 2985-2986 (1973).
- ¹⁰H. Otsuka, Y. Ogihara und S. Shibata, *Phytochemistry* **13**, 2016 (1974).
- ¹¹K. R. Hanson, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2731 (1966).
- ¹²E. L. Eliel, *J. Chem. Educ.* **48**, 163 (1971).
- ¹³D. Arigoni und E. L. Eliel, In *Topics of Stereochemistry*, Vol. 4, p. 127.
- ¹⁴W. Bähr und H. Theobald, *Organische Stereochemie*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York (1973).
- ¹⁵W. B. Jennings, *Chem. Rev.* **75**, 307 (1975).
- ¹⁶H. Hirschmann und K. R. Hanson, *J. Org. Chem.* **36**, 3292 (1971).
- ¹⁷J. B. Batchelor und J. Feeney, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 503 (1975).
- ¹⁸G. C. Levy und G. L. Nelson, *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*. Wiley-Interscience, New York (1972).
- ¹⁹E. Breitmaier und W. Voelter, *^{13}C -NMR-Spectroscopy*. Verlag Chemie, Weinheim (1974).
- ²⁰J. B. Stothers, *Carbon-13 NMR-Spectroscopy*. Academic Press, New York (1972).
- ²¹J. T. Clerc, E. Pretsch und S. Sternhell, *^{13}C -Kernresonanz-spektroskopie*, Akademische Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main (1973).
- ²²R. Deslauriers und I. C. P. Smith, *Conformation and Structure of Peptides in Topics in Carbon-13 NMR-Spectroscopy*, Vol. 2. Wiley Interscience, New York (1976).
- ²³*Topics in Carbon-13 NMR-Spectroscopy*, Vol. 2, S. 27. Wiley Interscience, New York (1976).
- ²⁴D. Demel und H. Kessler, *Tetrahedron Letters* **32**, 2801-2804 (1976).
- ²⁵T. Phil. Pitner und D. W. Urry, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1399 (1972).
- ²⁶K. D. Kopple, M. Ohnishi und A. Go, *Ibid.* **91**, 4264 (1969).
- ²⁷V. F. Bystrov, S. L. Portnova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov und Yu. A. Ovchinnikov, *Tetrahedron* **25**, 493-515 (1969).
- ²⁸V. F. Bystrov, V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova und Yu. A. Ovchinnikov, *Ibid.* **29**, 873-877 (1973).
- ²⁹M. Barfield und H. L. Gearhart, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 641-643 (1973).
- ³⁰J. B. Stothers, *Carbon-13 NMR-Spectroscopy*, p. 496. Academic Press, New York (1972).
- ³¹M. Pailer und E. Haslinger, *Monatsh. Chem.* **103**, 1399-1405 (1972).
- ³²R. A. Bell und K. Saunders, *Can. J. Chem.* **48**, 1114 (1970).
- ³³J. H. Noggle und R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect*. Academic Press, New York (1971).
- ³⁴P. E. Hansen, J. Freaney und G. C. K. Roberts, *J. Magn. Resonance* **17**, 249-261 (1975).
- ³⁵*Topics in Carbon-13 NMR-Spectroscopy*, Vol. 1, S. 64. Wiley Interscience, New York (1974).
- ³⁶C. M. Deber, V. Madison und E. R. Blout, *Accoun. Chem. Res.* **9**, 106 (1976).
- ³⁷S. H. Grover, J. P. Guthrie und J. B. Stothers, *J. Magn. Res.* **10**, 227-230 (1973).