

Trocknen die Flecken sofort sichtbar werden und man sich das Besprühen mit der Ninhydrin-Lösung erspart. Das gleiche gilt bei der eindimensionalen Papierchromatographie für verschiedene Lösungsmittelgemische, wobei es allerdings zu einer etwa 10-proz. Erhöhung der R_f -Werte kommt. Wir haben den Eindruck, daß die Methode, das Reagens bereits im Entwickler zu lösen, mit Erfolg auch bei anderen analogen Versuchen angewendet werden könnte, und sind mit der Prüfung dieses Verfahrens beschäftigt.

Die Herstellung und Auswertung der Retentiogramme wurden nach eindimensionaler Papierchromatographie und mit dem Entwickler Butanol, Eisessig, Wasser wie oben angegeben, im übrigen genau in der von Th. Wieland²⁵⁾ angegebenen Weise durchgeführt.

Wir beabsichtigen, die Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung der Hefeauscheidungsprodukte in einer späteren Arbeit zu veröffentlichen.

121. Theodor Wieland und Hans Merz: Über die Alkaloide aus Calebassen-Curare, VI. Mitteilung^{*)}**)

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz und dem Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt/Main]

(Eingegangen am 14. März 1952)

In Fortsetzung der von H. Wieland und Mitarbeitern durchgeführten Untersuchungen wurde eine auf der Basis der Papierchromatographie beruhende präparative Trennmethode der Calebassen-Inhaltsstoffe ausgearbeitet. Das hierbei u. a. isolierte C-Toxiferin II wurde als identisch mit dem Calebassin von P. Karrer erkannt; eine Umlagerungsreaktion dieses Stoffes wird beschrieben. Außerdem wurden einige weitere Alkaloide in kristallisierter Form isoliert und ihre Ähnlichkeit mit bekannten aufgezeigt.

Durch H. Wieland und seine Mitarbeiter sind die wirksamsten Inhaltsstoffe des südamerikanischen Pfeilgiftes Curare in kristallisierter Form isoliert worden. Im Laufe mehrerer Jahre gelang es im Münchner Laboratorium drei, in ihren Farbreaktionen und im spektroskopischen Verhalten verschiedene Gruppen von quartären Salzen gleichen Kohlenstoffgehalts (C_{20}) zu unterscheiden. Der Schlüssel, der diese Erkenntnisse zugänglich machte, war die Anwendung von Reineckesäure, mit der die toxischen Inhaltsstoffe der höchst komplizierten Mischung schwer lösliche Fällungen bilden, die durch Chromatographie an Aluminiumoxyd aufgespalten werden können.

Nach den Ereignissen von 1945 mußte die Fortsetzung der Arbeiten in München wegen der Zerstörung der dortigen Laboratorien unterbleiben und es vergingen einige Jahre, bis es gelang, neues Ausgangsmaterial zur Wiederaufnahme der abgebrochenen Untersuchungen aus Südamerika zu erhalten. Diese haben wir nun vor einiger Zeit wieder aufgenommen. Allerdings ist die Forschung auf diesem Gebiete in der Zwischenzeit nicht stehen geblieben; P. Karrer u. Mitarbb. haben sie in den Nachkriegsjahren fortgesetzt¹⁾ und in der Papierchromatographie und der Farbreaktion mit Cer(IV)-sulfat wertvolle Hilfsmittel für die Analytik dieses reichhaltigen Stoffgemisches ausfindig gemacht.

^{*)} Meinem lieben Vater und Lehrer zum 75. Geburtstag. *Th. Wieland.*

^{**)} I. Mittel.: A. 527, 160 [1937], II. Mittel.: A. 536, 68 [1938], III. Mittel.: A. 547, 140 [1941], IV. Mittel.: A. 547, 156 [1941], V. Mittel.: A. 558, 144 [1947].

¹⁾ *Helv. chim. Acta* 29, 1853 [1946], 30, 1162, 2081 [1947], 33, 512, 1486 [1950], 34, 2042 [1952].

Die durch die Arbeiten der Münchner Schule aus Calebassen isolierten Alkaloide sind dort in folgende Gruppen eingeteilt worden:

1.) C-Toxiferin I-Gruppe: C-Dihydrotoxiferin I, C-Isodihydrotoxiferin I und Toxiferin I, welches zuerst aus der Rinde von *Strychnos toxifera* isoliert²⁾ und später auch in Calebassen aufgefunden wurde³⁾. Diese giftigsten Inhaltsstoffe lähmen einen 25 g-Frosch mit 0.3–5 γ , geben mit Cer(IV)-sulfat oder Bichromat in 2*n* Schwefelsäure intensive Rotviolett-färbung, absorbieren das UV charakteristisch bei 290 $m\mu$ und weisen eine abnorm hohe spezifische Rotation (etwa -600°) auf.

2.) C-Toxiferin II-Gruppe: C-Toxiferin II, Toxiferin II, Toxiferin IIa, Toxiferin IIb und C-Curarin II. Diese mit 5–150 γ /Frosch wirksamen Stoffe geben mit konz. Salpetersäure eine charakteristische carminrote Farbe („Rotstoffe“), durch die sie von der Gruppe I leicht unterschieden werden können. Die rotviolette Cer(IV)-sulfat-Reaktion haben sie mit ihr gemeinsam. Das UV-Spektrum zeigt zwei charakteristische Absorptionen bei 250 $m\mu$ und 300 $m\mu$; $[\alpha]_D^{20}$ liegt bei etwa $+70^{\circ}$.

3.) C-Curarin I: Von diesem mit 3–4 γ wirksamen Alkaloid ist bisher noch kein verwandtes aufgefunden worden. Mit Cer(IV)-sulfat zeigt es eine tief blaue Farbreaktion; auffallend ist die mit konz. Salzsäure auftretende violette Halochromie. Die UV-Absorption hat bei 260 $m\mu$ und 290 $m\mu$ jeweils ein Maximum; die Drehung beträgt wie bei der Gruppe 2 etwa $+70^{\circ}$.

Außer diesen Giften wurde ein weiterer, mit 500 γ noch nicht wirksamer Inhaltsstoff, das C-Curarin III von $[\alpha]_D^{20} : -930^{\circ}$, einer blauvioletten Cer(IV)-sulfat-Reaktion und sonst wenig auffallenden Farbreaktionen isoliert.

Durch die Züricher Schule sind diesen Alkaloiden noch einige weitere hinzugefügt worden, nämlich ein in größerer Menge in den Calebassen enthaltener Rotstoff, Calebassin, und in kleiner Ausbeute zwei weitere hochtoxische kristallisierte Chloride (Alkaloid A und B), die sich allerdings später als einheitlich erwiesen haben⁴⁾. Zudem gelang es dort, einen gelb fluoreszierenden, nicht toxischen Inhaltsstoff papierchromatographisch aufzufinden und als Jodid zur Kristallisation zu bringen⁵⁾, ferner drei als Calebassinin, Alkaloid UB und Alkaloid X bezeichnete, unwirksame Stoffe kristallisiert zu erhalten⁵⁾.

Als wir 1950 die Aufarbeitung neuer venezolanischer Calebassen wieder aufnahmen, konnten wir uns die Erfahrungen, die Karrer mit der Papierchromatographie hier gesammelt hatte, zunutze machen. Es zeigte sich, daß auch die Extrakte unserer Calebassen in den beschriebenen Lösungsmittelgemischen⁶⁾ in zahlreiche Alkaloid-Flecken zerlegt wurden, die wir unschwer mit den bekannten Inhaltsstoffen in Zusammenhang bringen konnten. Zur Sichtbarmachung benutzten wir zunächst die angegebenen Nachweismethoden (Cer(IV)-sulfat-, Bichromat-2*n* Schwefelsäure), fanden aber bald im Zimt-aldehyd ein besonders geeignetes, ebenso empfindliches Reagens, das in einer

²⁾ A. 547, 159 [1941]. ³⁾ Helv. chim. Acta 30, 1164 [1947].

⁴⁾ Helv. chim. Acta 29, 1854 [1946], 33, 514 [1950].

⁵⁾ Helv. chim. Acta 30, 2082 [1947]. ⁶⁾ Helv. chim. Acta 33, 512 [1950].

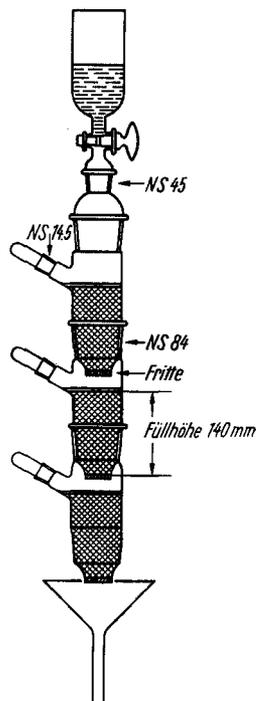
Atmosphäre von starker Salzsäure⁷⁾ mit den meisten Calebassen-Alkaloiden intensive und verschieden gefärbte Flecken von recht großer Beständigkeit gibt. Zahlreiche Indolalkaloide anderen Ursprungs zeigen das gleiche Verhalten. Ferner ließ sich die nur beim C-Curarin I auftretende Halochromie-Reaktion⁸⁾ zu seinem Nachweis im Papierchromatogramm heranziehen (s. Beschreibung der Versuche).

Einige im UV (290 *mu*) besonders stark absorbierende Alkaloide (C-Dihydrotoxiferin I, Alkaloid 2) verraten sich nach Besprühen mit verd. Fluorescein-Lösung als dunkelrote Flecken auf gelbgrün fluoreszierendem Grund bei Durchstrahlung mit Chlor-Brom-gefiltertem UV-Licht⁹⁾.

Die schönen Trenneffekte, welche sich auf Filtrierpapier bei diesem Alkaloid-Gemisch erzielen lassen, veranlaßten uns, die präparative Aufteilung durch Chromatographie an Papierpulver zu versuchen.

Da für diesen Zweck größere Mengen der recht kostspieligen Lösungsmittel aufgewendet werden müssen, haben wir in vielen Versuchen billigere Kombinationen durchgeprüft und schließlich in einer Mischung von 10 Tln. Essigester — 6 Tln. Pyridin — 3 Tln. Wasser (Lösungsmittel C) ein einphasiges Entwicklungsmittel gefunden, das im Trenneffekt dem ähnlichen A-Gemisch (obere Phase) von Karrer⁸⁾ entspricht. Auch Gemische von Äthylformiat, Aceton und Wasser (Lösungsmittel D) und Methyläthylketon, Pyridin und Wasser (Lösungsmittel E) haben sich gut bewährt (s. Versuchsteil). Als Adsorptionsmittel diente uns ein möglichst fein gepulvertes Cellulosemehl, das wir z.Tl. durch die Possehl-Erzgesellschaft Lübeck (Solka flocc), z.Tl. von der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim, bezogen. Es wurde in einer aus 3—6 Einheiten (\varnothing 8.4 cm, Füllhöhe 12—14 cm) bestehenden Säule, welche durch Normal-schliffe miteinander verbunden sind (s. Abbild. 1), zur Anwendung gebracht.

Durch die Aufteilung des Adsorptionsmittels in mehrere Abschnitte erreicht man eine weitgehend horizontale Ausbildung der Zonen während der gesamten Chromatographie, da in den oberen Teilen der Säule auftretende Unebenheiten beim Eintreten in die nächste Einheit durch den auf ihr befindlichen Flüssigkeitsspiegel wieder ausgeglichen werden¹⁰⁾. Zudem läßt sich eine gleichmäßige Füllung kurzer Säulen leichter bewerkstelligen. Zum fraktionierten Auffangen des Durchlaufs wurde ein automatischer Kollektor benutzt, der in Weiterentwicklung des vor einiger Zeit beschriebenen Geräts¹¹⁾ durch Hrn. Dr. E. Fischer konstruiert worden war.



Abbild. 1. Unterteilte Säule zur Chromatographie

⁷⁾ Vergl. Th. Wieland, A. 564, 154 [1949]; Angew. Chem. 63, 513 [1951].

⁸⁾ A. 547, 141 [1941].

⁹⁾ Th. Wieland u. L. Bauer, Angew. Chem. 63, 512 [1951].

¹⁰⁾ Vergl. auch L. Hagdahl, Acta chem. scand. 2, 574 [1948].

¹¹⁾ Chem. Ing. Techn. 22, 485 [1950].

Zur Vorreinigung wurde der Methanol-Extrakt¹²⁾ des Calebasseninhalts entweder in wäßriger Lösung an einer HCl-behandelten Aluminiumoxydsäule in das Chloridgemisch verwandelt oder durch Überführung in die wasserunlöslichen Pikrate von der Hauptmenge der Begleitstoffe befreit und in 50-proz. wäßr. Aceton an einem mit Chlor-Ionen beladenen organischen Anionenaustauscher zerlegt. Von einem so angereicherten Chloridgemisch ließen sich in einem Arbeitsgang bis zu 25 g an etwa 500 g Cellulosepulver in der oben beschriebenen Anordnung auftrennen. Die Filtrat-Fractionen (15 ccm) wurden papierchromatographisch auf ihre Inhaltsstoffe untersucht, wonach solche gleicher Zusammensetzung vereinigt wurden (vergl. Abbild. 9 im Versuchsteil). Die Fractionen waren z. Tl. bereits sehr einheitlich zusammengesetzt, so daß aus einigen von ihnen der größte Teil des C-Dihydrotoxiferins I unmittelbar als Chlorid kristallisiert werden konnte. Aus anderen Fractionen gelang es ohne Schwierigkeit, die kristallisierten Pikrate der Rotstoffe und des C-Curarin I abzuscheiden. In anderen Fractionen hatten sich weitere, durch ihre Farbreaktion auffallende Inhaltsstoffe so weit konzentriert, daß sie ebenfalls, wenn auch erst nach weiterer Reinigung, kristallisiert werden konnten.

Fast bei allen von uns aufgearbeiteten Calebassen bildeten die in Aceton schwer löslichen Rotstoffpikrate einen Hauptteil der toxischen Inhaltsstoffe. Ihre Überführung in die Chloride lieferte ein einheitliches Kristallinat, dessen Identität mit dem in München isolierten C-Toxiferin II papierchromatographisch bewiesen wurde. Auch die anderen Kriterien (Farbreaktion mit Zimtaldehyd-Salzsäure violett, mit Cer(IV)-sulfat-Schwefelsäure rotviolett, mit Salpetersäure carminrot, Toxizität 10 γ /25 g Frosch) zeigten eine völlige Übereinstimmung. Die Angaben über das von Karrer isolierte Calebassin¹³⁾ ließen vermuten, daß auch dieses mit C-Toxiferin II¹⁴⁾ identisch sei. Vergleiche eines Münchner Präparates mit einer Originalprobe von Calebassin, für deren Überlassung wir Hrn. Prof. Karrer auch an dieser Stelle vielmals danken möchten, bestätigten diese Vermutung.

Calebassin zeigt dieselbe Toxizität, dasselbe Absorptions-Spektrum¹⁵⁾ (Abbild. 2), dieselben Farbreaktionen, die gleichen R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln und ist wie C-Toxiferin II stabil gegen Säure und Aluminiumoxyd. Das 2-dimensionale Chromatogramm einer Mischung beider Präparate ergab nur einen Fleck. Auch mit dem von uns isolierten Alkaloid war völlige Übereinstimmung vorhanden.

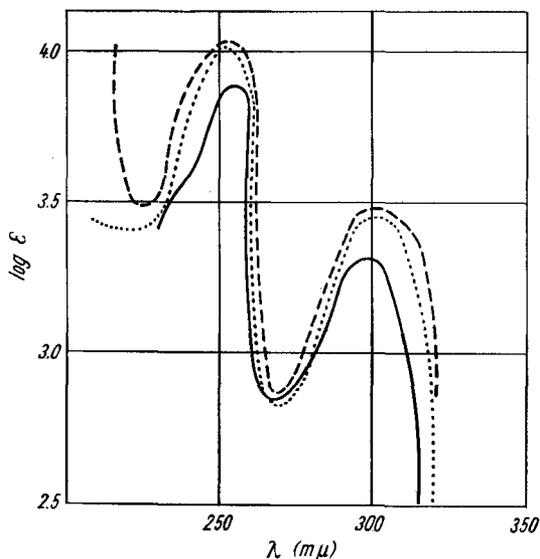
Wir haben an dem von uns isolierten C-Toxiferin II eine interessante, bisher nicht beschriebene Beobachtung gemacht: Nicht getrocknete Präparate zeigten nach längerem Aufbewahren im Papierchromatogramm zwei deutlich voneinander getrennte, in der Farbreaktion gleiche Flecken, während bei einer im Hochvakuum getrockneten Probe nach wie vor nur der eine Fleck des schneller wandernden C-Toxiferins II auftrat. Nach einer Umkristallisation der nicht getrockneten Probe aus Methanol-Äther war nun diese Komponente vollständig verschwunden und nur noch das langsamer wandernde Umwandlungsprodukt vorhanden. Gleichzeitig ging die Toxizität von

¹²⁾ A. 547, 144 [1941]. ¹³⁾ Helv. chim. Acta 29, 1866 [1946], 30, 1170 [1947].

¹⁴⁾ A. 547, 166 [1941].

¹⁵⁾ Vergl. A. 558, 146 [1947] u. Helv. chim. Acta 30, 1167 [1947].

10 γ auf 40 γ /25 g Frosch zurück und die Kristallform sowie das Röntgen-diagramm änderten sich in charakteristischer Weise, während die Summenformel und das UV-Spektrum gleich blieben (Abbild. 2).



Abbild. 2. Absorptions-Spektren einiger Rotstoffe in Wasser
C-Toxiferin II (München) ———, Calebassin (Zürich) — — —, C-Strychnotoxin Ia ·····

Unter den in München isolierten Rotstoffen verschiedener Toxizität befinden sich zwei Alkaloide, deren Wirksamkeit mit dem Umwandlungsprodukt vergleichbar ist: Toxiferin IIa¹⁶⁾ und C-Curarin II¹⁷⁾. Auf Grund seiner Stabilität gegen Aluminiumoxyd und seiner Kristallform (lange, dünne Nadeln) sowie der spezifischen Drehung von $+71.8^\circ$ läßt sich eine Identität nur mit C-Curarin II ($[\alpha]_D^{20}$: $+72.5^\circ$, $+74.3^\circ$) vermuten. Leider stand von diesem Präparat keine Vergleichsprobe mehr zur Verfügung. Trotz vieler Versuche gelang es uns bisher nicht, die Ursache dieser Isomerisierung mit Sicherheit zu erkennen. In einem Fall ließ sich auch das Münchner C-Toxiferin II unter Rückgang der Toxicität zum selben Stoff umlagern und das Züricher Calebassin erlitt ebenfalls bei einmaliger Umkristallisation dieselbe bisher unerklärliche Verwandlung.

Von der Identität der jeweiligen Umwandlungsprodukte überzeugten wir uns durch Vergleich der Röntgendiagramme, Kristallformen und der Toxicität, sowie der R_F -Werte im Lösungsmittel A.

C-Toxiferin II ist also mit Calebassin, sein Umlagerungsprodukt höchst wahrscheinlich mit C-Curarin II identisch. Die etwas verwirrende Nomenklatur in der Rotstoffgruppe (Toxiferin II, IIa und IIb, C-Toxiferin II, Calebassin, C-Curarin II), sowie die Tatsache, daß diese Klasse weder zum C-Curarin I noch zum Toxiferin I in einer engeren Beziehung zu stehen

¹⁶⁾ A. 547, 169, 176 [1941].

¹⁷⁾ A. 536, 76 [1938], 547, 151 [1941].

scheint, lassen es geraten erscheinen, für diese Gruppe eine neue Bezeichnung einzuführen. Wir schlagen den Namen Strychnotoxin-Gruppe vor, womit wir dem Vorkommen dieser Alkaloide in der Rinde von *Strychnos toxifera* Rechnung tragen. Bisher nur aus Calebassen isolierte Vertreter wird man am besten in der herkömmlichen Weise durch Vorsetzen des Buchstaben C kennzeichnen. Es wären dann:

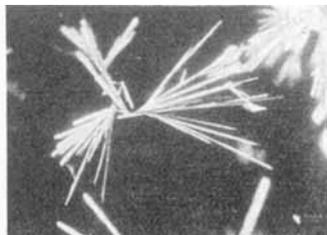
C-Toxiferin II u. Calebassin	als C-Strychnotoxin I,
C-Curarin II und Umlagerungsprodukt von C-Toxiferin II	als C-Strychnotoxin Ia,
Toxiferin II	als Strychnotoxin II,
Toxiferin IIa und IIb	als Strychnotoxin IIa u. IIb

zu bezeichnen.

Die Unterscheidung von C-Strychnotoxin I und Ia ist an den ausgeprägten Kristallformen leicht zu treffen. Während C-Strychnotoxin I in federförmigen Aggregaten mit subparallel verwachsenen Fasern (Abbild. 3) kristallisiert, stellt Ia divergent strahlig verwachsene Nadelbüschel dar (Abbild. 4).



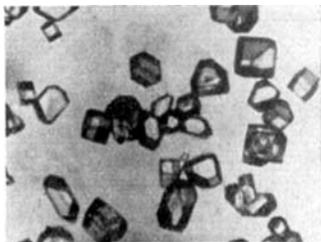
Abbild. 3. C-Strychnotoxin I-chlorid



Abbild. 4. C-Strychnotoxin Ia-chlorid

In einigen Fraktionen der chromatographischen Aufarbeitung war ein sich durch leuchtend purpurrote Zimtaldehyd-Reaktion auszeichnendes Alkaloid so stark angereichert, daß seine Isolierung aussichtsreich erschien. Es gelang durch weitere zweimalige Chromatographie an Cellulosepulver in anderen Lösungsmitteln und an Aluminiumoxyd in Methanol-Aceton (1:10) schließlich ein kristallisiertes Pikrat zu gewinnen. Dieses zeigte im Froschtest mit 500 γ noch keine Wirkung. Die Wurzelrinde einer südamerikanischen Droge, die uns als „Mavacure“ unter dem Hinweis ihrer Verwendung zur Pfeilgiftbereitung in Venezuela in die Hände kam, wies als Hauptinhaltsstoff dieses unverkennbare Alkaloid auf, das wir aus dem Chromatogramm eluiert und mit unserem Kristalliat im 2-dimensionalen Papierchromatogramm verglichen und identisch befunden haben. Wir schlagen deshalb den Namen C-Mavacurin vor. Außer diesem waren in größerer Zahl Zimtaldehyd-positive Komponenten zu erkennen, die auch in den Papierchromatogrammen der Pfeilgift-Calebassen, allerdings in geringeren Konzentrationen auftreten. Da die Toxizität des Mavacure-Extrakts nur bei etwa 200 γ liegt und die Hauptalkaloide des Calebassen-Curare völlig fehlen, trägt diese Pflanze mit Sicherheit nicht wesentlich zur Wirksamkeit des südamerikanischen Pfeilgiftes bei.

Ein weiteres kristallisiertes Alkaloid-chlorid $C_{20}H_{21}N_2Cl$ (Abbild. 5), das wir Alkaloid 1 benennen, fiel während der Isolierung des C-Mavacurins bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd an, von dem es stärker als jenes festgehalten wird. Im Absorptionsspektrum, der tiefblauen Bichromat-Schwefelsäure-Reaktion und der Schwerlöslichkeit in kaltem Wasser, ähnelt es sehr dem von H. King kürzlich aus *Strychnos toxifera* isolierten Toxiferin III¹⁸⁾. Leider war es uns bisher nicht möglich, eine Probe für den papierchromatographischen Vergleich zu erhalten. Beide Alkaloide sind praktisch unwirksam.



Abbild. 5. Alkaloid 1-chlorid

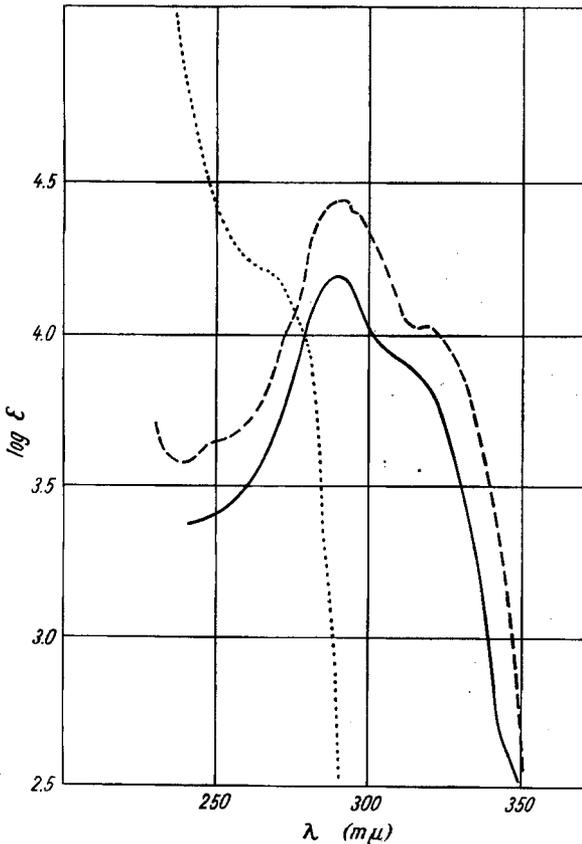
Abbild. 6. Verbindung $C_9H_8ON_2$

Die Fraktionen, in welchen das leuchtend gelbgrün fluoreszierende C-Fluorocurin auftritt, enthielten bei einigen Calebassen ein weiteres Alkaloid, das Herr A. Berg in unserem Laboratorium in kristallisierter Form als Chlorid isoliert hat. Seine Eigenschaften (Toxicität 5 γ , Absorptions-Spektrum (Abbild. 7), blaugrüne Zimtaldehyd-Reaktion, die gelbbraun verblaßt) deuten auf eine enge Verwandtschaft mit C-Dihydrotoxiferin I hin. Ob es mit dem aus Calebassen isolierten C-Isodihydrotoxiferin I¹⁹⁾ identisch ist, läßt sich aus Mangel an einem Originalpräparat dieser Verbindung nicht mit völliger Sicherheit feststellen. Die mit konz. Schwefelsäure und wenig Wasser dafür beschriebene Blaufärbung haben wir an unserem Präparat nicht beobachtet. Auch im $[\alpha]_D^{20}$ besteht eine geringfügige Discrepanz. Wir wollen das neue Alkaloid vorerst als Alkaloid 2 bezeichnen.

Schließlich sei noch von einem Begleitstoff berichtet, den wir aus Curare isoliert haben, das nicht wie üblich in einem Flaschenkürbis, sondern in einer halbierten, ausgehöhlten Frucht von *Strychnos toxifera* und in einer emaillierten Blechtasse aufbewahrt war. Die Papierchromatographie dieser identischen Produkte zeigte besonders zahlreiche und mit Zimtaldehyd in den verschiedensten Farben erscheinende Alkaloidflecken. Die an der Cellulosesäule am schnellsten wandernden Fraktionen enthielten einen in Aceton leicht löslichen Inhaltsstoff, der durch Chromatographie an Aluminiumoxyd in Aceton ohne Schwierigkeit gereinigt und aus Methanol in langen prismatischen Stäbchen (Abbild. 6) vom Schmp. 142° erhalten wurde. Die Analyse spricht für die Summenformel $C_9H_8ON_2$, womit auch die Mol.-Gew.-Bestimmung etwa übereinstimmt.

18) Journ. chem. Soc. London 1949, 3265.

19) A. 547, 165 [1941], 558, 146 [1947].



Abbild. 7. UV-Spektrum von C-Isodihydrotoxiferin I-chlorid (—) in Wasser, Alkaloid 2-chlorid (---) in Methanol und Verbindung $C_9H_8ON_2$ (.....) in Methanol

Die Substanz erwies sich weder als basisch noch als sauer und ist in Äther löslich. Sie enthält keine OCH_3 - oder NCH_3 -Gruppierung und zeigt im Gegensatz zu allen bisher aus Calebassen isolierten Stoffen eine zinnoberrote Zeitungspapier-Reaktion²⁰⁾. Mit Zimtaldehyd-Salzsäure gibt sie eine für einfache Indolkörper charakteristische orange bis hellbraune Farbreaktion, läßt jedoch bei der Zinkstaubdestillation keinen Indolgeruch auftreten. Besonders auffallend ist die intensive Rotviolett-färbung, die in konz. Schwefelsäure mit einer Spur Salpetersäure auftritt. Die Substanz ist nicht optisch aktiv, das Absorptions-Spektrum wenig charakteristisch (Abbild. 7).

Der Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, danken wir besonders für die Beschaffung der süd-amerikanischen Calebassen und verschiedener Drogen, der Poschle-Erzgesellschaft, Lübeck, und der Zellstoff-Fabrik Waldhof, Mannheim, für die Überlassung von Cellulosepulver.

Beschreibung der Versuche

Papierchromatographie²¹⁾: Die Papierchromatogramme wurden in der üblichen Weise, teils aufsteigend (Zylindermethode), teils absteigend in lackierten Holzkästen²²⁾ auf Schleicher & Schüll 2043 b-Papier durchgeführt. Nach dem Trocknen mit Warmluft wurden zuerst die im UV direkt fluoreszierend oder absorbierend erkennbaren Flecken markiert.

Lösungsmittel A: Obere Phase der Mischung aus 200 ccm Essigester, 90 ccm Pyridin und 200 ccm Wasser.

Lösungsmittel B: Obere Phase der Mischung aus 300 ccm Methyläthylketon, 15 ccm Glykolmonomethyläther und 70 ccm Wasser.

Lösungsmittel C: Mischung aus 1000 ccm Essigester, 600 ccm Pyridin und 300 ccm Wasser.

Lösungsmittel D: Mischung aus 1000 ccm Äthylformiat, 1450 ccm Aceton und 400 ccm Wasser.

Lösungsmittel E: Mischung aus 1400 ccm Methyläthylketon, 300 ccm Pyridin und 300 ccm Wasser.

Prüfung auf C-Curarin I: Die Chromatogramme werden nun in einem etwa 50 cm hohen, 35 cm breiten und ebenso tiefen Ganzglasbehälter, dessen Boden mit einer Mi-

²⁰⁾ Vergl. Th. Wieland, A. 564, 154 [1949]. ²¹⁾ Vergl. Helv. chim. Acta 33, 512 [1950].

²²⁾ Vergl. Th. Wieland u. U. Feld, Angew. Chem. 63, 259 [1951].

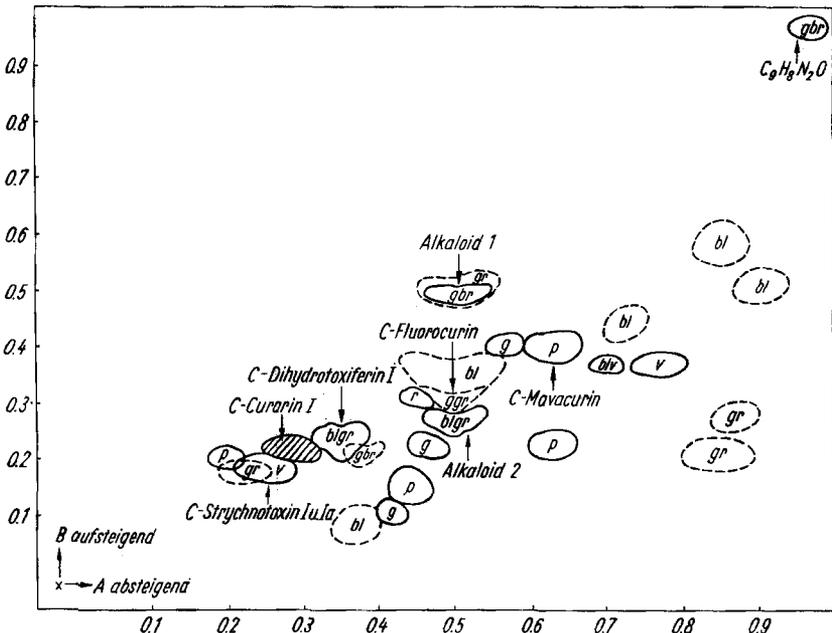
schung gleicher Teile konz. Schwefelsäure und konz. Salzsäure bedeckt ist, eingehängt. An der Stelle des C-Curarin I zeigt sich bald eine intensiv violette Färbung. Empfindlichkeit etwa 5 γ im Fleck von 2 cm \varnothing .

Zimtaldehyd-Reaktion: Die Bögen werden dann mit einer 1-proz. Lösung frisch dest. Zimtaldehyds in Methanol besprüht, an der Luft einige Minuten getrocknet und wieder in die HCl-Atmosphäre gebracht. Nach kurzer Zeit treten die intensiv gefärbten Flecken der verschiedenen Alkaloide (s. die Tafel) hervor.

Tafel. Zimtaldehyd-Reaktion einiger Indolalkaloide

Alkaloid	Farbe	verblaßt nach	Empfindlichkeit
C-Dihydrotoxiferin I	blaugrün	Gelbbraun	1 γ
Alkaloid 2	blaugrün	Gelbbraun	1 γ
(Yohimbin)	blau	Grau	1 γ
C-Strychnotoxin I	violett	Blaugrün	1 γ
C-Strychnotoxin Ia	violett	Blaugrün	1 γ
C-Curarin I	hellblau	—	1 γ
Alkaloid 1	gelbbraun	—	1 γ
C-Mavacurin	purpurrot	—	0.8 γ
C-Curarin III	gelb	—	—
C-Fluorocurin	schw. hellgrün	—	—
Neutr. Verbindung $C_9H_8ON_2$	orange	Hellbraun	0.5 γ

Die verschiedenen Farben der Zimtaldehyd-Reaktion geben neben den R_F -Werten direkt Aufschluß über die Natur der getrennten Komponenten. Das 2-dimensionale Chromatogramm der Inhaltsstoffe einer Calebasse ist in der Abbild. 8 schematisch dargestellt.

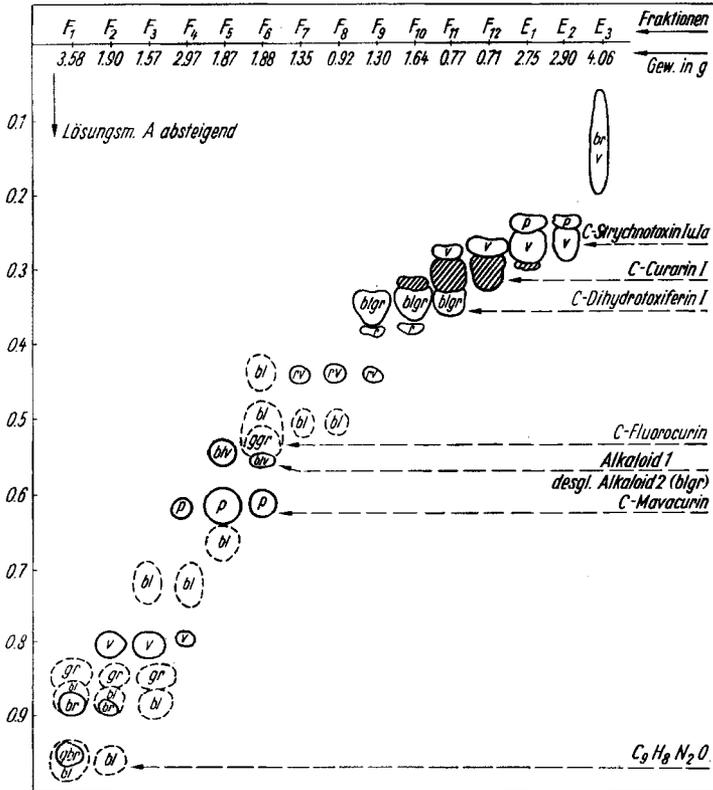


Abbild. 8. 2-Dimensionales Chromatogramm der mit Methanol extrahierten Inhaltsstoffe einer venezolanischen Calebasse

Einfache Umrandung: Zimtaldehyd-Reaktion, gestrichelte Umrandung: Fluorescenz i. UV, schraffiert: Halochromie; r=rot, v=violett, bl=blau, g=gelb, gr=grün, p=purpurrot, br=braun

Koordinaten: R_F -Werte

Chromatographie an Papierpulver: Die Einheiten der in der Abbild. 1 dargestellten zusammengesetzten Säule werden mit dem im verwendeten Lösungsmittel aufgeschlämmt Cellulosepulver unter Aufwirbeln mit einem Vibromischer gefüllt. Dann werden die gut mit Siliconfett geschmierten Schliffe miteinander verbunden. Nachdem zur Einstellung des Wassergleichgewichts einige Zeit Lösungsmittel durch die Säule gelaufen ist, bringt man das zu trennende Gemisch, auf Cellulosepulver niedergeschlagen



Abbild. 9. Papierchromatographische Verfolgung der Fraktionierung von 30 g Chloriden (2 Chromatographien) an Cellulosepulver in Lösungsmittel C

Einfache Umrandung: Zimtaldehyd-Reaktion, gestrichelte Umrandung: Fluoreszenz i. UV, schraffiert: Halochromie; r=rot, v=violett, bl=blau, g=gelb, gr=grün, p=purpurrot, br=braun

und im Lösungsmittel aufgeschlämmt, vorsichtig auf die obere Einheit. Sodann wird aus einem mit Schliff verbundenen Tropftrichter laufend Entwicklungsflüssigkeit aufgetropft. Durch die an jeder Einheit befindlichen seitlichen Ansätze läßt sich der Flüssigkeitsspiegel über jeder Adsorptionsschicht mittels einer Pipette auf die optimale Höhe von 1–2 mm einstellen, die sich bei dichtsitzenden Schliffen nicht mehr verändert. Sobald Inhaltsstoffe das untere Säulenende passieren, wird der Fraktionsautomat in Gang gesetzt. Wir haben meistens in Fraktionen von 15 cem unterteilt. Papierchromatographisch ähnliche Fraktionen wurden vereinigt und bei 35° i. Vak. eingedampft. Eine Darstellung der Auftrennung gibt die Abbild. 9.

Austausch an saurem Aluminiumoxyd: Durch eine Säule von etwa 1 kg mit $2n$ HCl bis zum bleibenden Kongoumschlag versetztem und dann bis zum Verschwinden dieser Reaktion mit Wasser gewaschenem Aluminiumoxyd (nach Brockmann) wird die rotbraune Lösung des Methanol-Extraktes eines 116 g schweren Calebassen-Inhalts (60 g) in 300 ccm Wasser filtriert. Dabei bleiben braune Verunreinigungen in der oberen Säulenhälfte hängen, während beim Nachwaschen mit Wasser bis zum Verschwinden der Cer(IV)-sulfat-Reaktion ein gelborangefarbenes Filtrat erhalten wird. Aus diesem entfernt man das in Spuren enthaltene Al^{3+} durch Versetzen mit Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion und Abfiltrieren des Hydroxyds. Die nunmehr Al-freie, aber NH_4Cl -haltige Lösung wird i. Vak. zur Trockne eingedampft; der Rückstand (Chloride) wiegt 30 g. Diese können direkt der Chromatographie an Cellulosepulver unterworfen werden. Zu einem gleichfalls brauchbaren Ausgangsmaterial kommt man über die Pikrate.

Fällung der Pikrate: Die wäbr. Lösung des Methanol-Auszugs einer 114 g schweren Calebasse (69 g) in etwa 300 ccm Wasser wird mit etwa 4 l kalt gesätt. wäbr. Pikrinsäure versetzt. Dann zentrifugiert man die Pikratfällung ab, wäscht mit wenig Wasser und trocknet i. Vak. bei Zimmertemperatur; Ausb. 22 g Pikrate.

Überführung in die Chloride: Man digeriert die Pikrate mit 300 ccm trockenem Aceton, worin sich alles bis auf eine geringe Menge löst. Aus der filtrierten Lösung kristallisieren über Nacht 210 mg Rotstoff-pikrat aus. Nach dem Filtrieren versetzt man mit der gleichen Menge heißen Wassers und läßt die klare Lösung durch eine Säule von 1–1.5 l Lewatit 35 (Farbenfabriken Bayer, Leverkusen), welcher vorher mit $2n$ HCl aktiviert und mit etwa 20 l Wasser neutral gewaschen war, durchtropfen. Das blaßgelbe, pikrinsäurefreie Filtrat wird i. Vak. zur Trockne eingedampft (10.5 g) und kann wie oben zur Verteilung an Cellulosepulver eingesetzt werden.

Kristallisation von C-Dihydrotoxiferin I-chlorid: Die Fraktionen F9 und F10 (Abbild. 9) wurden in wenig Methanol gelöst und im Exsiccator eingedunstet. Dabei erstarrte die Hauptmenge kristallin (866 mg). Es wurde mit wenig absol. Äthanol angerieben, abgesaugt und aus heißem *n*-Propanol umkristallisiert. Im 2-dimensionalen Papierchromatogramm (Lösungsmittel A und B) waren die Kristalle identisch mit dem Alkaloid aus dem Münchner Laboratorium. Toxizität, Analyse, $[\alpha]_D^{20}$, Schmp. d. Pikrats (185°) sowie alle Farbreaktionen stimmten völlig überein.

Isolierung von C-Strychnotoxin I-chlorid: Das methanol. Eluat des unteren Säulenabschnittes (E_2 , Abbild. 9) wurde i. Vak. eingedampft, in wenig Methanol gelöst und vorsichtig mit Äther gefällt. Nach Abtrennung brauner, amorpher Verunreinigungen kristallisierten beim weiteren Versetzen mit Äther 300 mg des Chlorids aus. Dieses erwies sich im 2-dimensionalen Papierchromatogramm in Lösungsmittel A und B mit Calebassin und C-Toxiferin II identisch. Ebenso stimmte es in seiner Toxizität und allen Farbreaktionen mit diesen Alkaloiden überein. Eine größere Menge C-Strychnotoxin-chlorid wurde über die Pikrate der Fraktionen F_9 – F_{12} und der Eluate E_2 und E_3 des unteren und mittleren Säulenabschnittes nach vorheriger Abtrennung des C-Dihydrotoxiferin I-chlorids isoliert. Diese wurden in schwach feuchtem Zustand mit Aceton angerieben, wobei alles in Lösung ging. Über Nacht kristallisierten 1.8 g hellgelbes Pikrat aus. Durch Extraktion im Soxhlet-Apparat mit trockenem Aceton wurde zunächst eine tiefgelb gefärbte Lösung erhalten, die vornehmlich C-Curarin I-pikrat enthielt (Halochromie). Nach längerem Extrahieren schieden sich gut ausgebildete Kristalle von C-Strychnotoxin-pikrat ab (1.2 g). Durch Lösen in 50-proz. wäbr. Aceton und Austausch an der Kunstharszsäule erhielten wir 683 mg kristallisiertes Chlorid, das sich im Papierchromatogramm als ein Gemisch von etwa gleichen Teilen C-Strychnotoxin I und Ia herausstellte.

Überführung in C-Strychnotoxin Ia-chlorid: Nach Filtrieren der Lösung des Alkaloidgemisches in Aceton-Methanol (5:1) durch Aluminiumoxyd (Brockmann) und Umkristallisieren des eingedampften Filtrats und Eluats aus Methanol-Äther ergaben sich in einer Ausbeute von 80% die charakteristischen langen Nadeln (Abbild. 4) des umge-

wandelten Alkaloids von der Toxizität 40 γ und einem R_F von 0.25 im Lösungsmittel A. Versuche zur Rückverwandlung in die wirksamere Ausgangssubstanz sind bisher erfolglos geblieben.

Isolierung von C-Curarin I-chlorid: Die Mutterlauge der Kristallisation von C-Strychnotoxin-pikrat wurde mit der gleichen Menge heißen Wassers versetzt. Aus der klaren Lösung schieden sich im Laufe einer Nacht 660 mg derbe, goldgelbe Kristalle vom Schmp. 300° aus. Diese wurden in 50-proz. wäbr. Aceton an der Kunstharzsäule in das Chlorid übergeführt, das beim Versetzen der konz. methanol. Lösung mit Äther in sternförmig angeordneten farblosen Nadelchen kristallisierte. Es stimmte in allen charakteristischen Farbreaktionen und im papierchromatographischen Verhalten mit einer Probe aus München überein. Bei der Aufarbeitung einiger Calebassen war die beschriebene Pikratfraktion noch mit C-Dihydrotoxiferin I verunreinigt. Durch fraktionierte Kristallisation der Chloride aus Methanol-Äther ließen sich die beiden, wenn auch mühsam, voneinander trennen.

C-Mavacurin: Dieses Alkaloid wurde aus der Fraktion F_5 (Abbild. 9) auf folgende Weise als kristallisiertes Pikrat gewonnen: Zunächst wurde die Fraktion an Cellulosepulver in Lösungsmittel D, sodann in Methanol-Aceton (1 : 10) an Aluminiumoxyd (Brockmann) chromatographiert, wobei die Substanz als zweite, im UV-Licht blaugrüne Zone zusammen mit wenig C-Fluorocurin durchtrat. Sämtliche C-Mavacurin enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und einer erneuten Chromatographie an Cellulosepulver in Lösungsmittel E unterworfen. Dabei wurde das Alkaloid chromatographisch rein erhalten und fiel nach Versetzen der wäbr. Lösung mit Pikrinsäure vollständig aus. Das amorphe Pikrat kristallisiert beim Anreiben mit Methyl-*n*-propyl-keton; Schmp. 172 bis 176° (Zers.).

Farbreaktionen: Zimtaldehyd-HCl intensiv purpurrot, Cer(IV)-sulfat-2*n*H₂SO₄ rotviolett, konz. Salpetersäure schwach gelbbraun, Eisen(III)-chlorid-konz. Schwefelsäure keine Reaktion. Toxizität: mit 500 γ unwirksam. R_F -Werte: 0.63 (in A absteigend), 0.45 (in B aufsteigend).

Alkaloid I befindet sich mit dem C-Mavacurin in einer Fraktion (F_5). Durch Chromatographie an Aluminium (Brockmann) läßt es sich davon abtrennen, indem es nach dem C-Mavacurin aus der Säule austritt. Die vereinigten Fraktionen, die dieses Alkaloid enthielten, schieden beim Verdunsten derbe, lange Nadeln ab. Diese wurden mit wenig kaltem *n*-Propanol gewaschen und aus Wasser umkristallisiert. Derbe, fast isometrische Kristalle (Abbild. 5) vom Schmp. 239–243° unter Dunkelfärbung; Ausb. 195 mg aus 30 g Chlorid-Gemisch.

$C_{20}H_{21}N_2Cl$ (324.7) Ber. C 74.00 H 6.47 N 8.63 Gef. C 73.99 H 6.84 N 8.97

Gewichtsabnahme bei 56° und 10⁻⁴ Torr über Diphosphorpentoxyd 9.72% (ber. für 2H₂O 9.98%), die beim Stehen an der Luft wieder aufgenommen werden (9.80%).

α : -0.12° (8.955 mg Trockensbst. in 1 ccm Wasser, 1-dm-Rohr); $[\alpha]_D^{25}$: -13.4°.

Toxizität: Mit 500 γ noch nicht wirksam.

Farbreaktionen: Zimtaldehyd-HCl bei geringer Alkaloidkonzentration gelbbraun, verblaßt an der Luft ganz, bei höherer Konzentration blauviolett, wird an der Luft blau. Cer(IV)-sulfat nur in starker Schwefelsäure tief blau. Mit Vanadat-Schwefelsäure (Mandlins Reagens) dunkelblau. Konz. Salpetersäure gelbgrün, Eisen(III)-chlorid-konz. Schwefelsäure blauviolett.

Das Absorptions-Spektrum zeigt ein breites Maximum bei 270 μ .

Alkaloid 2: Dieses Alkaloid war nur bei einigen Calebassen in den Fraktionen F_4 – F_6 der oben beschriebenen Calebassenaufarbeitung (Abbild. 9) enthalten. Durch chromatographische Adsorption an einem besonders aktiven Aluminiumoxyd in Methanol-Aceton (1 : 10) wurde es von dem es begleitenden C-Fluorocurin und anderen Inhaltsstoffen als schnellstwandernde Komponente abgetrennt. Beim Eindunsten der methanol. Lösung kristallisierte das Chlorid unmittelbar und wurde durch mehrmalige Umkristallisation aus Methanol-Äther rein gewonnen; Ausb. 15.5 mg.

α : -1.38° (4.184 mg Trockensbst. in 2 ccm wäbr. Äthanol (1 : 1), 1-dm-Rohr); $[\alpha]_D^{25}$: -659°.

Die spez. Drehung des C-Isodihydrotoxiferins I¹⁹⁾ wurde in München zu -566° angegeben. Aus den Daten (α : -6.80° , 10.66 mg Sbst. in 2 ccm Wasser, 2-dm-Rohr) errechnet sich aber ein Wert von -638° , der mit dem von uns gefundenen Drehwert größenordnungsmäßig übereinstimmt.

Toxicität: 5 γ /25 g Frosch.

Farbreaktionen: Zimtaldehyd-Salzsäure blau-blaugrün (verblaßt gelbbraun), Cer(IV)-sulfat-2n H₂SO₄ leuchtend rotviolett, konz. Schwefelsäure hellgrün, Eisen(III)-chlorid-konz. Schwefelsäure blau.

Verbindung C₉H₈ON₂: Die schnellstwandernde Fraktion der Cellulosepulver-Chromatographie des abnormal verpackten Curare wurde i. Vak. eingedampft und in Aceton durch 100 g Aluminiumoxyd (Brockmann) filtriert. Hierbei blieben alle fluorescierenden Begleitstoffe auf dem Adsorbens, und ein fast farbloses Filtrat trat aus. Nach Verdampfen des Acetons kristallisierte der Rückstand spontan. Aus Methanol prismatische Stäbchen (Abbild. 6) vom Schmp. 142°. Schwer löslich in Wasser, 2n NaOH, 2n HCl und kaltem Methanol, leicht in Aceton, Essigester und Äther.

C₉H₈ON₂ (160.1) Ber. C 67.53 H 4.98 N 17.49

Gef. C 67.65 H 5.12 N 17.06 Mol.-Gew. 144 (ebullioskop. i. Aceton)

Farbreaktionen: Zimtaldehyd-HCl orange (verblaßt gelbbraun), konz. Schwefelsäure mit einer Spur Salpetersäure intensiv rotviolett, Cer(IV)-sulfat-Reaktion auch in konz. Schwefelsäure negativ. Die Fichtenspanreaktion auf holzschliffhaltigem, ungeleimtem Zeitungspapier²⁰⁾ tritt besonders intensiv zinnberrot hervor, wenn man das mit einem Tropfen der verd. Lösung befeuchtete und getrocknete Papierblatt in eine HCl-Atmosphäre einbringt.

122. Hans Behringer und Hermann Weissauer: Über eine neue Synthese des β -Oxindolyl-(3)-alanins (α -Oxy-tryptophans); ein Beitrag zum Anwendungsbereich der Sörensen'schen Aminosäure-Synthese*)

[Aus dem Chemischen Universitäts-Laboratorium München]

(Eingegangen am 15. März 1952)

Es wird bewiesen, daß bei der Kondensation von Malonester mit Thiokresylmethyl-oxindol (II; R' = H, X = S·C₆H₄·CH₃) diese in 2-Stellung des Oxindolrings erfolgt, was auch für die Umsetzung einiger anderer aktiver Methylverbindungen mit Abkömmlingen des Oxymethylen-oxindols wahrscheinlich ist. Chlormethylen-oxindol (II; R' = H, X = Cl) läßt sich dagegen mit Natrium-formamino-malonester in den α -Carbäthoxy- α -formamino- β -[isatylyden-(3)]-propionsäureester (IV; R' = H, R'' = NH·CHO) überführen, der durch Reduktion und Totalhydrolyse β -Oxindolyl-(3)-alanin (I) liefert.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, aus dem erwähnten Zwischenprodukt IV das Dioxindolyl-alanin (XII) zu synthetisieren, das als Vorstufe des N'-Formyl-kynurenins beim biologischen Abbau des Tryptophans in Betracht kommt.

Für das β -Oxindolyl-(3)-alanin (I), welches man bis in die jüngste Zeit als vermeintliche Vorstufe bei der Bildung des Kynurenins im Verlauf des normalen biologischen Tryptophan-Abbaus angesehen hat¹⁾, sind vor kurzem zwei

*) Diese Untersuchung ist Herrn Geheimrat Professor Dr. Heinrich Wieland zum 75. Geburtstag gewidmet.

¹⁾ Vergl. T. Sakan u. O. Hayaishi, Journ. biol. Chem. 186, 177 [1950]; W. E. Knox u. A. H. Mehler, Journ. biol. Chem. 187, 419, 431 [1950]; C. E. Dalgliesh, W. E. Knox u. A. Neuberger, Nature 168, 20 [1951]; M. Mason u. C. P. Berg, Journ. biol. Chem. 188, 783 [1951]; H. Hellmann, Angew. Chem. 64, 112 [1952].