

RUDOLF TSCHESCHE und HEINRICH OCKENFELS

Über Kurchi-Alkaloide, V¹⁾**7 α -Hydroxy-conessin und Holonamin,
zwei neue Basen aus Kurchi-Rinde**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 8. April 1964)

Aus Kurchi-Rinde wurden die Alkaloide 7 α -Hydroxy-conessin und Holonamin, C₂₁H₂₇NO₂, isoliert. Die Konstitution des 7 α -Hydroxy-conessins wird bewiesen und sein genuines Vorkommen wahrscheinlich gemacht.

Aus dem Rindenextrakt von *Holarrhena antidysenterica* Wall. (Kurchi) gelang es durch Verteilungs- und Adsorptionschromatographie an Cellulose und Aluminiumoxyd und unter Verwendung neuer Lösungsmittelsysteme bei der Dünnschichtchromatographie, 2 bisher nicht bekannte Alkaloide zu isolieren. Das eine erwies sich als 7 α -Hydroxy-conessin, das andere wurde als Holonamin C₂₁H₂₇NO₂ bezeichnet; über die Konstitution des letzteren wird in der folgenden Arbeit²⁾ berichtet.

Die neuen Alkaloide wurden aus einem in Anlehnung an eine frühere Vorschrift³⁾ hergestellten wäßrig-methanolischen Rohextrakt erhalten, und zwar nach Trennung in einen polaren und einen unpolaren Anteil durch Ausschütteln mit Chloroform. Dem unpolaren Teil (Chloroform-Extrakt) wurden die Alkaloide mit Perchlorsäure entzogen; in der organischen Phase verblieben die Neutralstoffe (u. a. Holadyson⁴⁾). Aus einer dabei anfallenden öligen Zwischenschicht wurde nach Verteilen zwischen Chloroform/Wasser aus der Chloroformphase Conessin als Oxalat abgetrennt und aus der Mutterlauge nach wiederholter Chromatographie an Aluminiumoxyd Holonamin erhalten. Aus der HClO₄-Phase wurde durch Chromatographie an Cellulose und an Kieselgel ein Alkaloid gewonnen, das nach sechsmaliger Umkristallisation in den chromatographischen Systemen A, B und C nur einen Fleck ergab und zunächst für einheitlich angesehen wurde; in dem später angewandten System D traten jedoch zwei Flecke auf. Es handelte sich dabei um die beiden Epimeren des 7-Hydroxy-conessins, die an Kieselgel nicht aufgetrennt werden konnten; durch Chromatographie an Aluminiumoxyd wurde das 7 α -Epimere rein erhalten.

Die Annahme, daß es sich bei diesem neuen Alkaloid um ein Hydroxy-conessin handelte, lag auf Grund der Summenformel C₂₄H₄₀N₂O nahe. Dafür sprachen auch folgende Befunde: Die Base enthält auf Grund der ZEREWITINOFF-Bestimmung eine Hydroxylgruppe, die schon unter milden Bedingungen acetyliert wird und deshalb primär oder sekundär gebunden sein muß. Da die REINDEL-HOPPE-Reaktion negativ ausfällt, bei der Behandlung mit Formaldehyd/Ameisensäure keine Permethylierung

1) IV. Mitteil.: R. TSCHESCHE und P. OTTO, Chem. Ber. **95**, 1144 [1962].

2) VI. Mitteil.: R. TSCHESCHE und H. OCKENFELS, Chem. Ber. **97**, 2326 [1964], nachstehend.

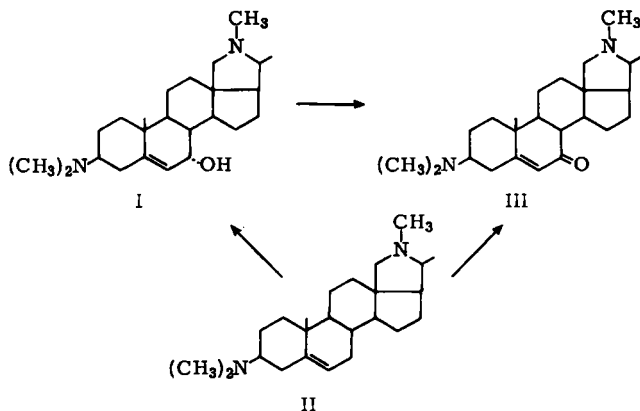
3) R. TSCHESCHE und R. PETERSEN, Chem. Ber. **87**, 1719 [1954].

4) R. TSCHESCHE, I. MÖRNER und G. SNATZKE, Liebigs Ann. Chem. **670**, 103 [1963].

eintritt und im IR-Spektrum keine N–H-Schwingungen, wohl aber N–CH₃-Schwingungen nachzuweisen sind, dürfte es sich um ein tertiäres Amin handeln. Die Anwesenheit einer Doppelbindung wird durch die Reaktion mit Brom und mit Permanganat wahrscheinlich.

Über die Stellung der Hydroxylgruppe konnte auf folgendem Wege entschieden werden: Oxydation mit Chromtrioxyd in Pyridin führt zu einer Base, die sich durch IR-Banden bei 1663 und 1620/cm als ein konjugiertes Sechsringketon ausweist. Darüber hinaus spricht das bei 236.5 m μ mit einem ϵ -Wert von 11100 auftretende UV-Maximum für ein homo-annulares konjugiertes Keton mit einer sekundär-tertiären Doppelbindung⁵. Demnach müßte das ursprüngliche Alkaloid eine allyl-ständige Hydroxylgruppe neben einer im gleichen Ring befindlichen dreifach substituierten Doppelbindung enthalten. Das NMR-Spektrum entspricht in den C-Methyl- und N-Methyl-Signalen dem Conessin. Es ist nur ein olefinisches Proton nachweisbar, dessen Signal ($\tau = 4.38$) jedoch gegenüber Conessin ($\tau = 4.65$) verschoben ist und als Dublett ($J = 5.5$ Hz) auftritt. Wenn sich die Doppelbindung wie beim Conessin in Δ^5 -Stellung befindet, muß die Hydroxylgruppe also an C-7 angenommen werden. Die Struktur eines 4-Hydroxy-conessins muß auch deswegen ausgeschlossen werden, weil die nach der Vorschrift von A. BERTHO⁶) hergestellten Epimeren⁷) im chromatographischen Verhalten und in den physikalischen Daten mit keinem unserer beiden Epimeren identisch sind.

Zum Strukturbeweis wurde 7 α -Hydroxy-conessin (I) durch Partialsynthese aus Conessin (II) hergestellt und seine Identität mit dem Naturprodukt nachgewiesen; zusätzlich wurde durch Allyloxydation des Conessins das konjugierte Keton III dargestellt und seine Identität mit dem aus dem Naturprodukt gewonnenen Keton gesichert:



Die Allyl-Bromierung von Conessin, die nach anschließender Hydrolyse zum 7-Hydroxy-Derivat führen sollte, ließ sich unter den angewandten Bedingungen

⁵) A. BUTENANDT und G. RUHENSTROTH-BAUER, Ber. dtsh. chem. Ges. 77, 397 [1944].

⁶) Liebigs Ann. Chem. 557, 220 [1947].

⁷) R. GOUTAREL, C. CONREUR und J. PARELLO, Bull. Soc. chim. France 1963, 2401, bestätigten die von BERTHO vorgeschlagene Struktur des 4 β -Hydroxy-conessins für das Selenioxyd-Oxydationsprodukt des Conessins.

nicht durchführen. Daher wurde die KHARASCH-SOSNOVSKY-Reaktion versucht, die erstmals von L. STÁRKA⁸⁾ zur Synthese von 7-Hydroxy-Derivaten der Δ^5 -Pregnen- bzw. Δ^5 -Androsten-Reihe benutzt wurde. Die Acetoxylierung von Conessin mit Perbenzoesäure-tert.-butylester in Eisessig und Kupfer(I)-bromid als Katalysator ergab nach der Verseifung ein Epimerengemisch; die Reaktion verlief jedoch wesentlich schlechter als bei den von STÁRKA eingesetzten Substanzen und war weder durch Verlängerung der Reaktionszeit noch durch härtere Reaktionsbedingungen zu verbessern. Wegen der Säureempfindlichkeit der 7-Hydroxy-Derivate des Conessins und ihres sehr ähnlichen chromatographischen Verhaltens gelang die Auftrennung an Kieselgelsäulen mit chloroformhaltigen Elutionsmitteln nicht. Die Verwendung von Benzol/Methanol an neutralem Aluminiumoxyd führte schließlich zu einer Ausbeute von 6% des 7 α - und 3% des 7 β -Epimeren. Das synthetische 7 α -Hydroxy-conessin stimmte in allen Daten mit dem natürlichen Material überein⁹⁾. Die Zuordnung der beiden Epimeren ergibt sich auf Grund des Drehungsincrementes gegenüber dem Ausgangsprodukt und des chromatographischen Verhaltens.

7-Keto-conessin wurde in Anlehnung an ein Verfahren von K. HEUSLER und A. WETTSTEIN¹⁰⁾ durch Allyloxydation von Conessin mit tert.-Butylchromat in Tetrachlorkohlenstoff in Gegenwart von Eisessig/Acetanhydrid hergestellt. Mit 7.7% war die Ausbeute auch hierbei erheblich geringer als bei N-freien Δ^5 -Steroiden. Wegen der großen Säureempfindlichkeit des Ketons, das bereits durch eintägiges Stehenlassen in Chloroform oder in Essigester bei Raumtemperatur verändert wird, waren saure oder chloroformhaltige Systeme zur Abtrennung des Reaktionsproduktes von Conessin auf der Säule ungeeignet. Auch bei der Säulenchromatographie an neutralem Aluminiumoxyd mit Benzol/Methanol wurde 7-Keto-conessin verändert. Die Trennung gelang jedoch durch präparative Dünnschichtchromatographie im System D, da bei dieser Methode die Einwirkungszeit des chloroformhaltigen Fließmittels im Gegensatz zur Fraktionierung auf der Säule nur kurz ist. Beim Umkristallisieren darf wegen der thermischen Labilität des Ketons nicht erwärmt werden. Aus Aceton konnte schließlich einheitliches 7-Keto-conessin isoliert werden; es war mit dem durch Chromtrioxyd-Oxydation von natürlichem 7 α -Hydroxy-conessin hergestellten konjugierten Keton identisch⁹⁾.

Um festzustellen, ob 7 α -Hydroxy-conessin bei der Isolierung aus der Rinde durch Autoxydation entstanden sein könnte, wurde eine Conessinlösung der Einwirkung von Luft-sauerstoff ausgesetzt und unter Verwendung möglichst empfindlicher Anfärbemethoden dünn-schichtchromatographisch auf die Bildung von 7 α -Hydroxy-conessin geprüft. Hierbei wählte man die Bedingungen derart, daß sie den Umständen bei der Isolierung möglichst entsprachen, jedoch zum Teil energischer als diese waren. So ließ man eine Lösung von

⁸⁾ Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2452 [1961].

⁹⁾ S. M. KUPCHAN, C. J. SH, S. KUBOTA und A. M. RAHIM, Tetrahedron Letters [London] **26**, 1767 [1963], stellten inzwischen die beiden Epimeren des 7-Hydroxy-conessins durch mikrobiologische Oxydation von Conessin her; die Oxydation dieser Substanzen mit Chromsäure führte zu 7-Keto-conessin. Die physikalischen Daten dieser drei Verbindungen stimmen bis auf eine Ausnahme mit den von uns gefundenen überein: Während unser 7 β -Hydroxy-conessin, das nach allen Kriterien einheitlich ist und mit Sicherheit kein α -Epimeres mehr enthält, eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: $+32.5 \pm 1^\circ$ (Chlf., $c = 0.8$) zeigt, fanden die genannten Autoren $[\alpha]_D^{20}$: $+42^\circ$ (Chlf., $c = 0.91$).

¹⁰⁾ Helv. chim. Acta **35**, 284 [1952].

Conessin in 3*n* HClO₄ 8 Tage unter häufigem Schütteln bei Raumtemperatur an der Luft stehen und saugte 5 Stdn. bei 50° einen intensiven Luftstrom durch die Lösung. Außerdem wurde eine Lösung von Conessin in Chloroform mit 1*n* NaOH überschichtet und bei 50° 20 Stdn. mit einem starken Luftstrom behandelt. Unter diesen Umständen konnte keine Spur 7α-Hydroxy-conessin nachgewiesen werden. Bei den von O. WINTERSTEINER und S. BERGSTRÖM¹¹⁾ für die Autoxydation des Cholesterins angegebenen Bedingungen trat keinerlei Veränderung des Conessins ein, während Cholesterin stark angegriffen wurde. Danach ist zu vermuten, daß 7α-Hydroxy-conessin kein Artefakt, sondern ein natives Alkaloid der Kurchi-Rinde darstellt. Ob das ebenfalls nachgewiesene stabilere 7β-Epimere erst im Verlauf der Aufarbeitung durch Isomerisierung entsteht, kann bisher nicht entschieden werden¹²⁾.

Wir danken der FARBERWERKE HOECHST AG vielmals für die Beschaffung und Extraktion der Kurchi-Rinde und Herrn Dr. W. MEISE für seine freundliche Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Allgemeines: Die Schmelzpunkte wurden nach KOFLER in der Anordnung von WEYGAND und die spezif. Drehungen mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 141 bestimmt. Die IR-Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, in Chloroform mit dem Perkin-Elmer-Gerät 221, die UV-Spektren in Methanol mit dem Spektrophotometer Cary 14 aufgenommen. Den Circular dichroismus bestimmte man mit dem Roussel-Jouan-Dichrographen; zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde ein Varian-Spektrometer (A-60) und Deuteriochloroform als Lösungsmittel benutzt. Die C,H,N-Analysen führte Dr.-Ing. A. SCHÖLLER (Kronach) aus. A. BERNHARDT (Mülheim/Ruhr) bestimmte den aktiven Wasserstoff nach ZEREWITNOFF. Die Acetylbestimmungen sowie die Molekulargewichtsbestimmung führte Dr. F. PASCHER (Bonn) aus.

Papierchromatographie: Gemisch A: Chloroform/Äthylenglykolmonomethyläther/Eisessig = 17:10:5, gesättigt mit Wasser. Das Papier wird 3 Min. in einer Mischung von Wasser und Aceton (1:4) imprägniert und zwischen trockenem Filterpapier abgepreßt. Nach dem Auftragen wird das Chromatogramm zur Äquilibrierung 12–15 Stdn. in einen mit beiden Phasen gesättigten Zylinder gehängt. Gemisch B: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5, obere Phase. Dieses System bietet trotz geringem Trennvermögen die Möglichkeit, einheitliche Alkaloide durch gut reproduzierbare *R_F*-Werte zu charakterisieren. Durch Verwendung der „*R_{0,53}*-Werte“¹³⁾, bezogen auf Conessin vom *R_F*-Wert 0.53, wird die Fehlerbreite weiter verringert. — In beiden Systemen wird das Papier Nr. 2043b Mgl (Schleicher & Schüll) verwendet und absteigend chromatographiert; die entwickelten Chromatogramme werden 15 Min. bei 100° getrocknet und die Alkaloide durch Besprühen mit wasserfreiem DRAGENDORFFS Reagenz in der Modifikation nach H. THIES und F. W. REUTHER¹⁴⁾ sichtbar gemacht.

¹¹⁾ J. biol. Chemistry 137, 785 [1941] und spätere Arbeiten, ebenda.

¹²⁾ *Ann. b. d. Korr.* (30. 6. 64): Inzwischen wurden die Epimeren des 7-Hydroxy-conessins sowohl von S. M. KUPCHAN et al.⁹⁾ als auch von E. L. PATTERSON et al. (*Experientia* [Basel] 20, 256 [1964]) durch mikrobiologische Hydroxylierung von Conessin erhalten. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß auch die von uns in der Kurchi-Rinde aufgefundenen 7-Hydroxy-Derivate des Conessins unter dem Einfluß von Mikroorganismen gebildet worden sind.

¹³⁾ H. ROSTOCK und E. SEEBECK, *Helv. chim. Acta* 41, 11 [1958].

¹⁴⁾ *Naturwissenschaften* 41, 230 [1954].

Dünnschichtchromatographie: Gemisch C: Chloroform/Methanol/konz. wäbr. Ammoniak = 60:40:1.5. Gemisch D¹⁵⁾: Chloroform/Cyclohexan/Diäthylamin = 5:4:1. Gemisch E: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5, obere Phase. — Als Träger wurde Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie nach STAHL (Firma Merck) verwendet. Meist genügten Glasplatten der Größe 8 × 12 cm für die Trennung der Alkaloide; bei kleinen und bei wenig differenzierten R_F -Werten empfahl sich die Verwendung von etwas längeren Platten (8 × 17 cm). Die chromatographischen Konstanten wurden auf Platten dieser Größe festgelegt; der auf Conessin als Standard bezogene R_{St} -Wert wird als R_{Con} -Wert bezeichnet. — Die mit System C entwickelten Chromatogramme wurden etwa 10 Min. bei 100°, die anderen etwa 20 Min. bei 130° getrocknet. Die Alkaloide wurden durch Ansprühen mit wäßrigem DRAGENDORFFS Reagenz nach R. MUNIER und M. MACHEBOEUF¹⁶⁾ sichtbar gemacht; um eine zu starke Untergrundfärbung zu vermeiden, wurde die Stammlösung doppelt so stark verdünnt wie nach der Originalvorschrift. Die Empfindlichkeit der Anfärbung kann durch erneutes Besprühen der lufttrockenen Platten mit 0.05 n H₂SO₄ bedeutend gesteigert werden¹⁷⁾. Die Gemische C, D und E ergänzen sich gut; durch geschickte Kombination der drei Systeme läßt sich jedes noch so komplexe Gemisch von Kurchi-Alkaloiden auftrennen. Außerdem kann man die Leistungsfähigkeit des Systems C durch Variation des Verhältnisses Chloroform: Methanol und durch Erhöhung des NH₃-Gehaltes besonders für polarere Alkaloide noch steigern.

Säulenchromatographie: Für die Verteilungschromatographie wurde Cellulosepulver Nr. 123 (Schleicher & Schüll) verwendet. Zur Adsorptionschromatographie diente neutrales Al₂O₃ (Woelm), Aktivitätsstufe 4, das durch Sieben auf einheitliche Korngröße (71–90 μ, wenn nicht anders angegeben) gebracht wurde.

Gruppentrennung der Alkaloide: 77 kg fein gemahlene Kurchi-Rinde wurden mit einer Mischung von 154 l Chloroform, 154 l Methanol und 30 l konz. wäßrigem NH₃ extrahiert. Der Extraktionsrückstand wurde auf der Zentrifuge mit etwa 50 l eines Chloroform/Methanol-Gemisches nachgewaschen. Die vereinigten Extrakte wurden i. Vak. auf 15 l eingengt. Der Rohextrakt wurde dreimal mit je 4 l Chloroform und einmal mit 2 l Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden zur Entfernung von Schmierstoffen mit ca. 500 g Celite 535 durchgerührt, nach 2 Stdn. abgenutscht und mit 4 l 1 n HClO₄ geschüttelt. Um pH 1 zu erreichen, mußten noch 4.5 l 3 n HClO₄ zu der stark gepufferten Emulsion gegeben werden. Beim Zentrifugieren bildete sich zwischen der Chloroformphase und der wäßrigen Phase eine braune, ölige Schicht, die für sich verarbeitet wurde (s. u.). Bei der zweiten Extraktion der Chloroformphase mit 9 l 2 n HClO₄ zeigte sich nach dem Zentrifugieren der Emulsion keine Zwischenschicht mehr. Die mit 5 l Wasser gewaschene Chloroformlösung enthielt die Neutralstoffe, aus denen Holadyson isoliert werden konnte⁴⁾.

Die vereinigten HClO₄-Extrakte wurden unter Eiskühlung mit NaOH auf pH 10 eingestellt. Die als farbloser Niederschlag ausgefallenen Basen gingen bei zweimaligem Ausschütteln mit je 4 l Chloroform in Lösung. Die Chloroformauszüge extrahierte man viermal mit je 3 l 1 n HCl, brachte die sauren Extrakte mit NaOH auf pH 10 und nahm die freien Basen in insgesamt 9 l Chloroform auf; hierbei blieb ein Teil der Farbstoffe in der alkalisch-wäßrigen Schicht zurück. Die Chloroformlösung lieferte nach dem Abdampfen bei 35° i. Vak. 96 g „Alkaloide A“ in Form eines braunen Sirups.

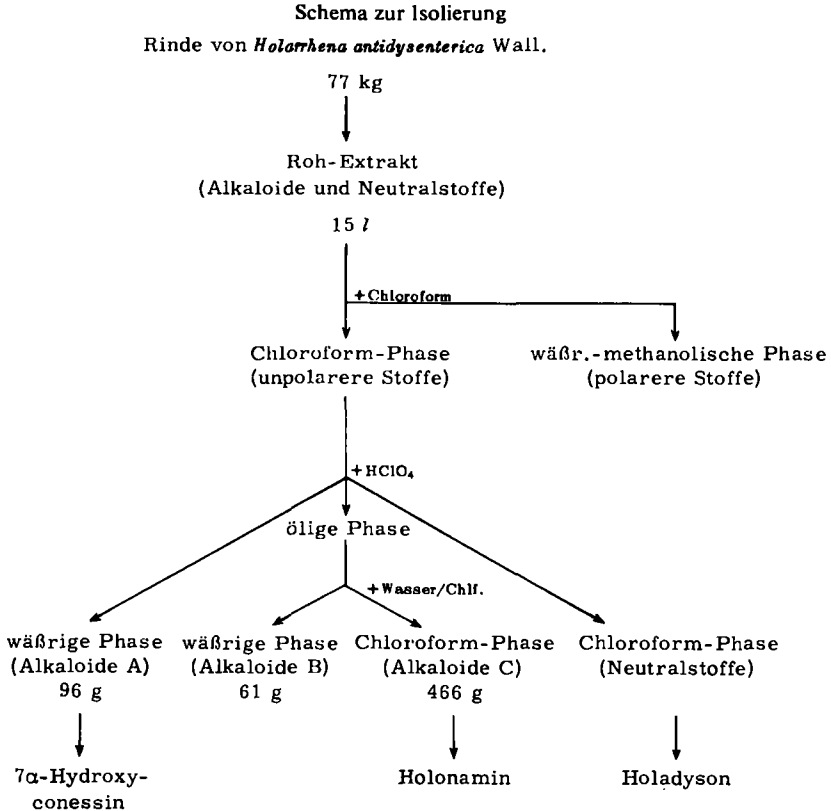
Die erwähnte ölige Schicht der Perchlorsäure-Ausschüttlung wurde zwischen 4.5 l Chloroform, 1 l Methanol und 2.5 l 2 n NaOH verteilt. Die methanolisch-wäßrige Schicht enthielt

¹⁵⁾ In Anlehnung an D. WALDI, K. SCHNACKERZ und F. MUNTER, *J. Chromatogr.* [Amsterdam] **6**, 61 [1961].

¹⁶⁾ cf. R. MUNIER, *Bull. Soc. chim. France* **1952**, 852.

¹⁷⁾ D. VÁGÚFALVI, *Planta med.* [Stuttgart] **8**, 34 [1960].

den größten Teil der Schmutzstoffe und konnte nach erneutem Ausschütteln mit einer Mischung von 1.5 l Chloroform und 0.5 l Methanol verworfen werden. Die vereinigten Chloroformlösungen wurden einmal mit 4 l und viermal mit je 3 l 1 n HCl extrahiert, die salzsauren Extrakte mit NaOH auf pH 10 eingestellt und die ausfallenden freien Basen durch zweimaliges Ausschütteln in insgesamt 8 l Chloroform aufgenommen; zur weiteren Abtrennung von Farbstoffen wurde dieser Arbeitsgang noch einmal wiederholt. Beim Ausschütteln der vereinigten Chloroformauszüge (7.5 l) mit 4 l Wasser ging ein Teil der Basen (nach Eindampfen 61 g „Alkaloide B“) in die wäßrige Phase; nach Einengen der Chloroformphase bei 45° i. Vak. hinterblieben 466 g eines dunklen Sirups („Alkaloide C“).



Isolierung von Holonamin: 420 g der „Alkaloide C“ wurden in 440 ccm siedendem Äthanol (99-proz.) gelöst und zu der heißen Lösung von 420 g Oxalsäure in 840 ccm Äthanol (99-proz.) gegeben. Nach Impfen mit saurem Conessinoxalat und längerem Stehenlassen im Eisschrank schieden sich insgesamt 61 g Conessin in Form des sauren Oxalates ab. Die Mutterlauge wurde bei 35° i. Vak. eingedampft; den sirupösen Rückstand löste man in 2 l dest. Wasser. Ausschütteln der sauren wäßrigen Lösung mit Chloroform (1.1; 0.8; 0.5 l) ergab 220 g „chloroformlösliche Oxalate“.

Die wäßrige Phase wurde mit konz. NH_3 alkalisch gemacht und mit insgesamt 3 l Chloroform in vier Anteilen ausgeschüttelt. Die nach Einengen bei 35° i. Vak. hinterbleibenden 162 g Alkaloide wurden in Chloroform gelöst, bei 35° i. Vak. auf 400 g Al_2O_3 aufgezogen und auf eine mit Benzol eingeschlammte 45×8 cm-Säule von 1000 g Al_2O_3 gegeben.

Nach Elution mit fünfmal 2 l eines Gemisches von Benzol und steigenden Mengen Methanol (0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0%) und Eindampfen der vereinigten Fraktionen bei 35° i. Vak. wurden 92.3 g Basengemisch wiedergewonnen, der größte Teil der Farbstoffe blieb am Säulenkopf zurück.

Diese Basen wurden in 250 ccm Benzol gelöst und auf eine 63 × 8 cm-Säule von 3 kg Al₂O₃ gegeben. Die 2-l-Fraktionen wurden bei 35° i. Vak. eingedampft.

Fraktion	Elutionsmittel	Gewicht
1–3	Benzol	31.5 g
4	Benzol + 0.125% Methanol	2.6 g
5	Benzol + 0.25% Methanol	1.75 g
6	Benzol + 0.5% Methanol	1.4 g
7–8	Benzol + 0.75% Methanol	1.38 g
9	Benzol + 1.25% Methanol	0.9 g
10	Benzol + 1.75% Methanol	0.93 g
11	Benzol + 3.0% Methanol	1.25 g
12–16	Benzol + 5.0% Methanol	37.21 g
17	Benzol + 5.0% Methanol	4.40 g
		83.32 g

Beim Einengen der Fraktion 17 auf ca. 0.5 l kristallisierten 393 mg *Holonamin* aus. Nach eintägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur hatten sich erneut 365 mg chromatographisch reines *Holonamin* abgeschieden.

Isolierung von 7 α -Hydroxy-conessin

Verteilungschromatographie an Cellulose: Bei der Übertragung des papierchromatographischen Systems A in den präparativen Maßstab versagte die sonst übliche Verdrängungsmethode, da die stationäre (wäßrige) Phase spezifisch leichter als die mobile (Chloroform-) Phase ist. Die Cellulose wurde daher in mobiler Phase suspendiert und mit einer definierten Menge stationärer Phase versetzt; das genaue Zahlenverhältnis wurde in Vorversuchen so festgelegt, daß der Träger vollständig imprägniert wurde, jedoch kein Überschuß an stationärer Phase vorhanden war.

Mobile Phase: Chloroform/Äthylenglykolmonomethyläther/Eisessig/Wasser = 17:10:5:4, untere Phase.

Stationäre Phase: Chloroform/Äthylenglykolmonomethyläther/Eisessig/Wasser = 17:10:5:20, obere Phase.

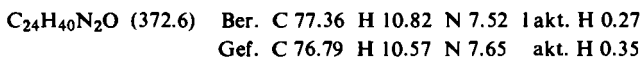
800 g Cellulose wurden in 3 l der mobilen Phase 1 Min. gerührt; dann gab man 272 ccm der stationären Phase hinzu, rührte nochmals 2 Min. und ließ über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Die Suspension wurde erneut aufgewirbelt und in kleinen Anteilen unter häufigem Feststampfen in eine 45 × 8 cm-Säule eingebracht, die vorher mit 0.8 l mobiler Phase gefüllt worden war. Nachdem ca. 1 V₀ (1.25 l) aus der fertigen Säule abgelaufen war, trug man die Lösung von 8 g „Alkaloidgemisch A“ in 60 ccm der mobilen Phase auf und wusch dreimal mit wenig reiner mobiler Phase nach. Bei einer Laufgeschwindigkeit von ca. 50 ccm/Stde. wurden insgesamt 42 Fraktionen zu je 100 ccm aufgefangen. In einer zweiten Säule trennte man nochmals 8 g Alkaloide; die vereinigten Fraktionen 14–42 beider Säulen ergaben nach dem Eindampfen bei 50° i. Vak. einen tiefbraunen Sirup (5.8 g), den man in 100 ccm Wasser löste. Nach dem Alkalisigmachen mit konz. wäßr. Ammoniak extrahierte man die freien Basen durch fünfmaliges Schütteln mit insgesamt 600 ccm Chloroform; die vereinigten Chloroformextrakte wurden bei 30° i. Vak. zu einem braunen Schaum (2.56 g) eingedampft.

Adsorptionschromatographie an Al₂O₃: Diese 2.56 g Basen wurden in Chloroform auf 45 g Al₂O₃ bei 30° i. Vak. aufgezogen. Zur groben Abtrennung von Farbstoffen eluierte man, ohne zu fraktionieren, mit 0.9 l Benzol/1.5% Methanol in einer 2.5 cm dicken Säule aus 85 g Al₂O₃. Nach dem Eindampfen bei 30° i. Vak. hinterblieb ein hellbrauner Schaum (1.15 g), den man in Chloroform löste und auf 10 g Al₂O₃ (Korngröße 63–71 μ) bei 30° i. Vak. aufzog. Die Alkaloide wurden sorgfältig an Al₂O₃ (90 g, 63–71 μ; 110 × 1.2 cm; Fraktionsvol. 140 ccm) chromatographiert:

Fraktion	Elutionsmittel	Gewicht	Produkt
1–23	Benzol	45 mg	?
24–26	Benzol + 0.25% Methanol	—	—
27–31	Benzol + 0.25% Methanol	135 mg	?
32–33	Benzol + 0.25% Methanol	41 mg	7α + ?
34–44	Benzol + 0.25% Methanol	131 mg	7α
45–47	Benzol + 0.5% Methanol	18 mg	7α
48–54	Benzol + 2% Methanol	555 mg	7α + 7β
		925 mg	

Die vereinigten Fraktionen 34–47 ergaben nach dem Eindampfen bei 30° i. Vak. einen farblosen Sirup (149 mg), der bei Zugabe von Essigester kristallisierte (Schmp. 172–173°); Umkristallisation aus Benzol ergab 102 mg reines 7α-Hydroxy-conessin.

Natürliches 7α-Hydroxy-conessin kristallisiert aus Benzol in farblosen Prismen vom Schmp. 176–178°. $[\alpha]_D^{20}$: $-61 \pm 1^\circ$ (Chlf., $c = 0.95$). $R_{0.53} = 0.35$ (System B), $R_{Con} = 0.62$ (System C) bzw. 0.50 (System D). Zur Analyse wurde 5 Stdn. bei 40° über P₂O₅ i. Hochvak. getrocknet



Im UV findet sich keine charakteristische Absorption, im IR (CCl₄) erkennt man die O–H-Bande bei 3613/cm und die N-Methyl-Banden bei 2772 und 2824/cm. τ-Werte des NMR-Spektrums: 7.01 (A-Teil von AB): CH₂-18; 7.68/s (6): N(CH₃)₂-3; 7.77/s (3): NCH₃-18.20; 8.93/d/J = 6.5 Hz (3): CH₃-21; 9.07/s (3): CH₃-19 – diese fünf Signale entsprechen denen des Conessins –; 4.38/d/J = 5.5 Hz (1): CH-6 (4.65 bei Conessin); 6.05 (1): CH-7 (fehlt bei Conessin).

Das Alkaloid gibt eine deutliche Rotfärbung mit DRAGENDORFFS Reagenz und eine himmelblaue CARR-PRICE-Reaktion (auf der Kieselgel-Platte bei 120°). Die REINDEL-HOPPE-Reaktion verläuft negativ. Die Base addiert Brom in Chloroform und gibt mit Tetranitromethan eine intensive Gelbfärbung. Kaliumpermanganatlösung wird durch die als Sulfat vorliegende Base entfärbt. 7α-Hydroxy-conessin ist äußerst säureempfindlich. Schon beim Stehenlassen in Chloroform bei Raumtemperatur treten merkliche Veränderungen auf; es wird Wasser abgespalten, und als Dehydratisierungsprodukte entstehen durch Isomerisierung mindestens drei unpolare Basen.

Das Alkaloid zeigt mit synthetischem 7α-Hydroxy-conessin im Misch-Schmp. keine Depression, die IR-Spektren und das chromatographische Verhalten in den Systemen B, C und D sind vollkommen gleich.

Acetylierung: Mit Pyridin/Acetanhydrid wird bei Raumtemperatur ein Monoacetat gebildet. Da das Gemisch der 7-Hydroxy-Derivate eingesetzt wurde, kommt dem Schmelzpunkt (148–150°) wenig Bedeutung zu. Das IR-Spektrum enthält keine OH-Bande mehr, die Acetylbanden treten bei 1728 und 1250/cm auf. $R_{0.53} = 0.44$ (System B). Zur Analyse wurde 4 Stdn. bei 65° über P₂O₅ i. Hochvak. getrocknet.



7 α - und 7 β -Hydroxy-conessin aus Conessin: Zu einer Lösung von 3 g *Conessin* in 30 ccm Eisessig tropfte man nach Zugabe von 3 g *Kupfer (I)-bromid* bei 120–130° (Badtemperatur) innerhalb von 15 Min. unter Rühren und Stickstoff-Atmosphäre die Mischung von 9 ccm *Perbenzoesäure-tert.-butylester*¹⁸⁾ und 33 ccm Eisessig und rührte noch 15 Min. bei der gleichen Temperatur. Das erkaltete Reaktionsgemisch wurde über eine Glasfritte filtriert, der Rückstand mit 35 ccm Eisessig ausgewaschen und das tiefgrüne Filtrat nach Zugabe von 350 ccm Chloroform mit insgesamt 800 ccm 6-proz. HCl in 4 Partien ausgeschüttelt. Die vereinigten sauren Extrakte wurden in einem Scheidetrichter mit 600 ccm Chloroform unterschichtet, mit 150 g Eis versetzt und mit konz. wäbr. NaOH alkalisch gemacht. Nach dem Schütteln trennte man die organische Phase ab und schüttelte die zentrifugierte wäßrige Schicht noch dreimal mit je 250 ccm Chloroform aus. Die vereinigten Chloroform-Extrakte ergaben nach dem Filtrieren und Eindampfen bei 30° i. Vak. einen braunen Sirup (2.97 g), in dem sich chromatographisch (System D) neben unverändertem *Conessin* die erheblich polarerer 7-Hydroxy-Derivate nachweisen ließen, von denen das unpolare 7 α -Derivat in höherer Konzentration vorlag. Daneben waren noch geringe Mengen anderer Basen vorhanden, die sich nur wenig polarer als *Conessin* verhielten und somit nicht die gesuchten 7-Hydroxy-Derivate sein konnten. Zur vollständigen Verseifung erwärmte man den Sirup in 300 ccm Methanol und 30 ccm 2*n* KOH 30 Stdn. auf 40°. Dann wurde bei 40° i. Vak. unter mehrmaligem Zusatz von Benzol eingedampft und der trockne Rückstand an einer 55 × 2 cm-Säule von 120 g Al₂O₃ (Korngröße 90–100 μ) chromatographiert:

Fraktion	Elutionsmittel	Volumen	Gewicht	Produkt
1	Benzol + 1/3 % Methanol	1.5 l	1.317 g	Conessin + ? + 7 α
2	Benzol + 1/3 % Methanol	0.5 l	0.069 g	7 α
3–6	Benzol + 1/3 % Methanol	je 0.65 l	0.119 g	7 α
7	Benzol + 1.5 % Methanol	1 l	0.348 g	7 β + ?

Die vereinigten Fraktionen 2–6 ergaben beim Anreiben mit Essigester 188 mg (6% d. Th.) chromatographisch reines *7 α -Hydroxy-conessin* vom Schmp. 173–175°. Nach dem Umkristallisieren aus 1.5 ccm Benzol erhielt man 127 mg farblose Prismen vom Schmp. 176 bis 178°. $[\alpha]_D^{20}$: $-59 \pm 2^\circ$ (Chlf., $c = 0.83$); $R_{Con} = 0.50$ (System D) bzw. 0.62 (System C); IR: O–H-Bande bei 3613/cm (CCl₄); CARR-PRICE-Reaktion himmelblau. Zur Analyse wurde bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C₂₄H₄₀N₂O (372.6) Ber. C 77.36 H 10.82 N 7.52 Gef. C 77.52 H 11.08 N 7.55

Fraktion 7 wurde an Al₂O₃ mit Benzol/Methanol rechromatographiert; das so gewonnene *7 β -Hydroxy-conessin* (94 mg, 3% d. Th.) kristallisierte bei Zugabe von Essigester und ergab, aus 1.4 ccm Benzol umkristallisiert, 66 mg farblose Prismen vom Schmp. 210–212°. $[\alpha]_D^{20}$: $+32.5 \pm 1^\circ$ (Chlf., $c = 0.8$); $R_{Con} = 0.42$ (System D) bzw. 0.62 (System C); IR: O–H-Banden bei 3624 und 3603/cm (CCl₄); CARR-PRICE-Reaktion himmelblau. Zur Analyse wurde bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

C₂₄H₄₀N₂O (372.6) Ber. C 77.36 H 10.82 N 7.52 Gef. C 77.27 H 10.72 N 7.75

7-Keto-conessin

a) *Aus Conessin:* Zu der Lösung von 2.46 g *Conessin* in 25 ccm trockenem CCl₄ gab man 6 ccm Eisessig und 1.5 ccm Acetanhydrid. Dann wurde bei 58–60° (Badtemperatur) eine Mischung von 33 ccm frisch hergestellter *tert.-Butylchromat*-Lösung¹⁰⁾, 6 ccm Eisessig und 1.5 ccm Acetanhydrid innerhalb von 60 Min. zugetropft. Nach 11 stdg. Rühren bei 58–60° fügte man das Gemisch von 20 ccm CCl₄, 6 ccm Eisessig und 1.5 ccm Acetanhydrid zu und rührte noch 12 Stdn. bei der gleichen Temperatur.

¹⁸⁾ N. A. MILAS und D. M. SURGENOR, J. Amer. chem. Soc. **68**, 642 [1946]. Der als schwach gelbe Flüssigkeit beschriebene Perester war absolut farblos; Sdp._{0.1} 60–61°, n_D^{20} 1.4995.

Das abgekühlte Reaktionsgemisch goß man in 700 ccm Wasser, gab den in 150 ccm Eisessig aufgeschlämmten Rückstand hinzu, rührte 2 Stdn. bei Raumtemperatur und saugte von dem fein verteilten Cr_2O_3 ab. Die saure wäßrige Phase extrahierte man mit Chloroform (500, 300, 300 ccm); die vereinigten Extrakte wurden nach dem Trocknen über wasserfreiem MgSO_4 bei 40° i. Vak. zum „Rückstand A“ (1.2 g eines grünen Sirups) eingedampft. Dann wurde mit konz. wäßr. NH_3 alkalisch gemacht und erneut mit Chloroform (500, 300, 300 ccm) ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroform-Extrakte ergaben nach dem Trocknen über wasserfreiem MgSO_4 und Eindampfen bei 35° i. Vak. den tiefbraunen „Rückstand B“ (1.3 g).

Der „Rückstand A“ enthielt nur unwesentliche Mengen an konjugiertem Keton und konnte daher verworfen werden. Der „Rückstand B“ bestand nach dem Dünnschichtchromatogramm (System D) aus etwa gleichen Anteilen von Conessin und nur einer neuen Base, die durch ihr UV- und IR-Spektrum als das gesuchte Reaktionsprodukt charakterisiert wurde. Bei der Trennung dieses Gemisches an 10 Platten (20×20 cm mit je 15 g Kieselgel) ließ sich das konjugierte Keton auf der lufttrockenen Platte durch seine hellblaue Fluoreszenz unter der langwelligen UV-Lampe (366 m μ) erkennen.

Das mit 7-Keto-conessin beladene Kieselgel wurde abgekratzt, in eine mit 5 g Al_2O_3 (Korngröße 63–71 μ) gefüllte Säule gegeben und mit 120 ccm einer Mischung von Chloroform/Methanol/konz. $\text{NH}_3 = 60 : 40 : 1.2$ eluiert. Nach dem Eindampfen bei 20° i. Vak. hinterblieb ein schwach bräunlicher Sirup, der nach Zugabe von Essigester 197 mg (7.7% d. Th.) chromatographisch einheitlicher Kristalle vom Schmp. $153\text{--}156^\circ$ ergab. Nach viermaligem Umkristallisieren aus Aceton, wobei die Temperatur von 20° nicht überschritten wurde, erhielt man 36 mg farblose flache Prismen vom Schmp. $159\text{--}161^\circ$. $[\alpha]_D^{20}$: $-57 \pm 2^\circ$ (Chlf., $c = 0.85$); $R_{\text{Con}} = 0.82$ (System D) bzw. 1.09 (System C); IR: Enon-Banden bei 1663 und 1620/cm (KBr); UV: $\lambda_{\text{max}} = 236.5$ m μ ($\epsilon = 11100 \pm 300$). Zur Analyse wurde 3 Stdn. bei 60° i. Hochvak. über P_2O_5 getrocknet.

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}$ (370.6) Ber. C 77.78 H 10.34 N 7.56 Gef. C 77.78 H 10.08 N 7.54

b) *Aus natürlichem 7 α -Hydroxy-conessin*: Zu einer Suspension von 200 mg *Chromtrioxyl* in 3 ccm Pyridin gab man die Lösung von 160 mg natürlichem 7 α -Hydroxy-conessin in 3.5 ccm Pyridin und ließ nach Zugabe von einem Tropfen Wasser bei Raumtemperatur stehen. Nach 36 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch auf 50 ccm Eiswasser gegossen und mit NaOH alkalisch gemacht; die Basen wurden durch viermaliges Ausschütteln mit insgesamt 200 ccm Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Extrakte ergaben nach dem Eindampfen bei 35° i. Vak. einen dunklen Sirup, in dem sich auf der Dünnschichtplatte im System C neben nicht umgesetztem Ausgangsprodukt ca. 80% 7-Keto-conessin nachweisen ließen. Durch präparative Dünnschichtchromatographie im System C erhielt man 34 mg (21% d. Th.) chromatographisch einheitlicher Kristalle vom Schmp. $154\text{--}156^\circ$. Dreimaliges Umkristallisieren aus Aceton ergab 9 mg farblose flache Prismen vom Schmp. $159\text{--}161^\circ$, identisch mit authent. 7-Keto-conessin (Misch-Schmp., IR-Spektrum in KBr, chromatographisches Verhalten in den Systemen B, C und D).