

de laquelle la consommation d'oxydant est mesurée, et à 25°, pendant l'oxydation pour la détermination de l'ammoniaque libérée. Dans cette détermination, il est nécessaire d'introduire quelques gouttes d'alcool octylique pour empêcher la formation de mousses, lors de la distillation en présence d'oxyde de magnésium. Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions pour chaque détermination. Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

Nous remercions M. E. Forchielli pour son aide dans la préparation de l'ester méthyl-lique de l'acide hyaluronique méthylé et M. M. Spivak pour son aide dans le dosage des groupes méthoxyles esters et glycosidiques.

SUMMARY.

Action of methanolic hydrochloric acid on the methyl ester of methylated hyaluronic acid does not produce monosides. Thus, periodate oxidation of the split product cannot be used to establish the structure of hyaluronic acid.

A microdetermination of the glycosidic methoxyl groups is described.

Research Laboratories of the Medical Clinic, Massachusetts General Hospital, et Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School, Boston, Mass., U.S.A.

34. Isolierung von Alstonin aus afrikanischen Rauwolfia-Arten

von E. Schlittler, H. Schwarz und F. Bader.

(14. XII. 51.)

*Siddiqui & Siddiqui*¹⁾ haben als erste die beiden Alkaloide Ajmalin und Serpentin aus der indischen Rauwolfia serpentina *Benth.* isoliert. Mit der Chemie des Ajmalins haben sich *Robinson* und Mitarb.²⁾ befasst, während die Konstitution des Serpentin von *E. Schlittler & H. Schwarz*³⁾ aufgeklärt worden ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, afrikanische Rauwolfia-Arten vergleichend auf ihren Alkaloidgehalt zu prüfen. Dazu standen uns Rauwolfia vomitoria *Afzel* und Rauwolfia obscura *K. Schum.* zur Verfügung⁴⁾. Wir haben dieses Pflanzenmaterial ähnlich aufgearbeitet, wie dies früher beschrieben worden ist³⁾. Ein prinzipieller Unterschied bestand darin, dass keine Vorextraktion mit Äthylen-

¹⁾ *S. Siddiqui & R. H. Siddiqui*, J. Ind. Chem. Soc. **8**, 667 (1931); **9**, 539 (1932); **12**, 37 (1935); **16**, 421 (1939).

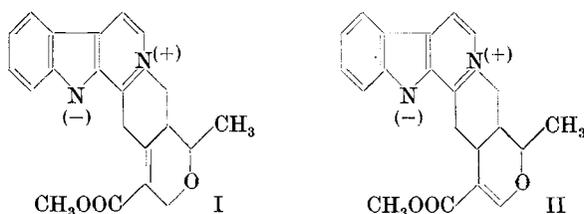
²⁾ *D. Mukherji, R. Robinson & E. Schlittler*, Exper. **5**, 215 (1949).

³⁾ *E. Schlittler & H. Schwarz*, Helv. **33**, 1463 (1950).

⁴⁾ Die Wurzeln von Rauwolfia vomitoria verdanken wir Père *Callens* vom botanischen Garten Kisantu (Belg. Kongo). Die Rinden von Rauwolfia obscura hat uns Herr Dr. *P. Speiser* (Afrikaexpedition der Universität Basel 1950) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

chlorid durchgeführt, sondern direkt mit neutralem Methanol extrahiert wurde. Die schwachen Basen konnten leicht abgetrennt werden; sie erwiesen sich als mit Ajmalin identisch. Die starken Basen waren noch weniger stabil als unsere früheren Serpentinfraktionen, und die aus ihren Salzen hergestellte freie Base war so unbeständig, dass sie mit Serpentin unmöglich identisch sein konnte. Ein Vergleich des Perchlorats und Nitrats sowie der freien Base mit authentischen Alstoninproben, die uns Herr Dr. *R. C. Elderfield* freundlicherweise zur Verfügung stellte, zeigte, dass wir aus beiden Pflanzen Alstonin¹⁾ isoliert hatten. Die Alstoninbase ist bis jetzt nur als Hydrat isoliert worden; unter besonderen Bedingungen (s. experimenteller Teil) kann aber auch ein lösungsmittelfreies Kristallisat erhalten werden.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit geben *Elderfield & Gray*²⁾ dem Alstonin die Struktur I; auf Grund des IR.-Spektrums würden wir die Formulierung II vorziehen:



Die beiden Alstonine aus *R. vomitoria* und *R. obscura* wurden anschliessend noch in alkalischer Lösung mit Platin zum Py-tetrahydroderivat hydriert. Auch diese Hydrierungsprodukte waren in jeder Beziehung identisch mit einem authentischen Präparat von Dr. *Elderfield*.

Der *CIBA-Stiftung* danken wir für die Gewährung finanzieller Mittel bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit.

Experimenteller Teil.

Extraktion des Alstonins: a) *Aus Rauwolfia vomitoria*: 6 kg gemahlene Wurzeln von *R. vomitoria* wurden mit 64 l Methanol percoliert; das Percolat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand (449 g) wurde zweimal mit je 500 cm³ Wasser ausgeknetet. Die dabei erhaltene dunkelgelbe, wässrige Lösung wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht (A) und darauf mit Äther + 10% Methanol so lange ausgeschüttelt, bis kein Alkaloid mehr an das Lösungsmittelgemisch abgegeben wurde. Der Äther-Methanol-Extrakt enthielt die schwachen Basen. Er wurde mit kleinen Portionen 2-n. Salzsäure ausgeschüttelt; nach kurzem Stehen kristallisierte aus der salzsauren Lösung Ajmalinhydrochlorid aus. Total wurden 10 g Ajmalinhydrochlorid gewonnen.

Die ammoniakalische Mutterlauge A wurde mit Eisessig schwach angesäuert, im Vakuum konzentriert, mit Ammoniak sehr stark alkalisch gemacht und mit Amylalkohol erschöpfend ausgezogen. Diese Behandlung mit Amylalkohol hat sich zur Abtrennung stets anfallender Mengen von Harzen sehr gut bewährt.

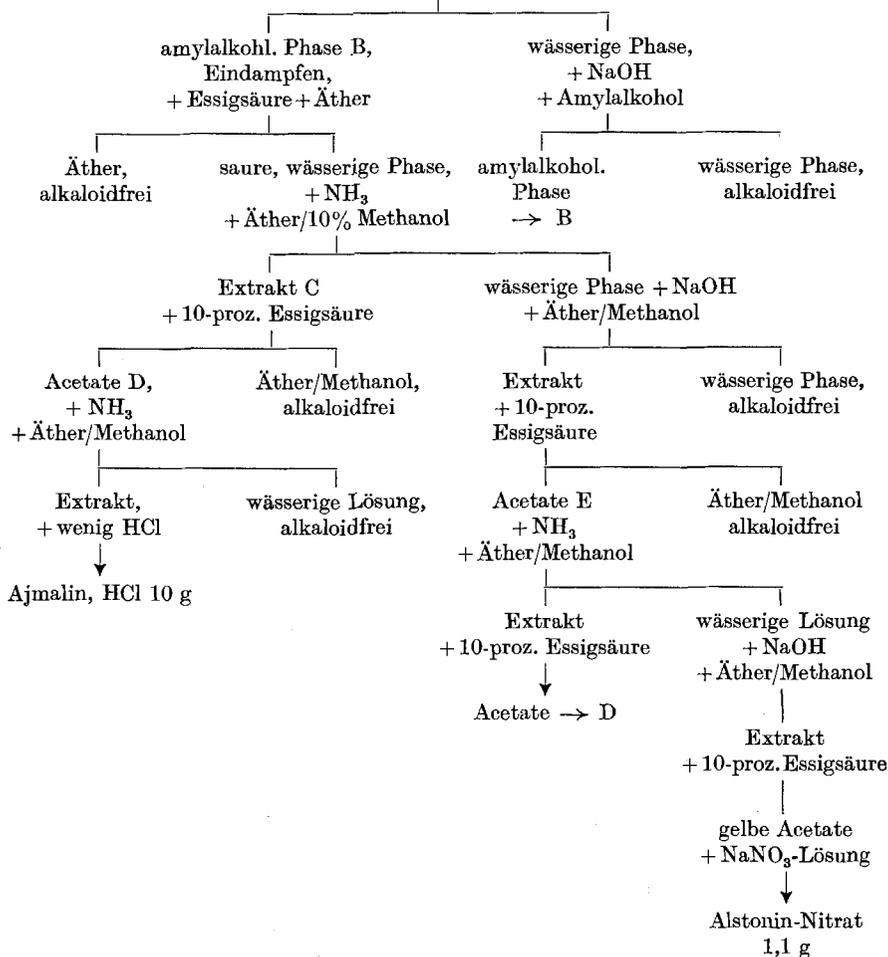
Die weitere Verarbeitung des amyalkoholischen Extraktes ist aus dem unten wiedergegebenen Extraktionsschema ersichtlich.

¹⁾ *T. Sharp*, Soc. **1934**, 287; **1938**, 1353; *N. J. Leonard & R. C. Elderfield*, J. Org. Chem. **7**, 556 (1942); *Raymond-Hamet*, C. r. **227**, 344 (1948).

²⁾ *R. C. Elderfield & A. P. Gray*, J. Org. Chem. **16**, 506 (1951).

Extraktionsschema.

Ammoniakalische Mutterlauge A + Eisessig,
Eindampfen + NH₃ + Amylalkohol



b) *Aus Rauwolfia obscura*: Die Extraktion der Rinden von *R. obscura* erfolgte prinzipiell gleich wie diejenige der Wurzeln von *R. vomitoria*. Wir erhielten jedoch in diesem Falle eine geringere Fraktion schwacher Basen, aus der wir kein Ajmalinhydrochlorid isolieren konnten. Da wir bei der Aufarbeitung des *Vomitoria*-Extraktes Mühe hatten, das Nitrat der Base kristallin zu erhalten, fällten wir aus der essigsäuren Lösung des *Obscura*-Extraktes (im Schema mit E bezeichnet) die Base direkt mit konzentrierter, wässriger Natriumperchlorat-Lösung als Perchlorat. Wir erhielten auf diese Weise aus 12,5 kg Rinde 4,9 g Alstoninperchlorat.

Salze des Alstonins. *Nitrat*: Das Nitrat aus *R. vomitoria* wurde dreimal aus Wasser umkristallisiert. Zur Analyse wurde 24 Std. bei 0,01 mm und Zimmertemperatur getrocknet. Das so erhaltene Nitrat enthielt ein halbes Mol Kristallwasser; Smp. 152—154°, bei ca. 160—170° Verfestigung, endgültiger Smp. 252—253° (252—253°, *Leonard & Elderfield*,

loc. cit.). Das wasserfreie Nitrat war sehr hygroskopisch und konnte nicht analysiert werden.

$C_{21}H_{20}O_3N_2 \cdot HNO_3, \frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 60,15	H 5,16	N 10,0%
	Gef. ,, 59,87; 60,10	,, 5,11; 5,39	,, 10,14; 10,41%
$[\alpha]_D^{21} = +164^\circ \pm 4^\circ; +165^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,97$, abs. Methanol, $l = 1$ dm)			

Perchlorat: Aus der wässrigen Lösung des Nitrats aus *R. vomitoria* wurde mit konzentrierter $NaClO_4$ -Lösung das Perchlorat gefällt, welches einmal aus Aceton und anschliessend zweimal aus Aceton/Wasser umkristallisiert wurde. Das Perchlorat war gelblich, Smp. 232—233° (239—240°, *L., E.*). Zur Analyse wurde 8 Std. bei 0,01 mm und 80° getrocknet.

$C_{21}H_{20}O_3N_2 \cdot HClO_4$	Ber. C 56,19	H 4,72	N 6,24%
	Gef. ,, 56,11; 56,33	,, 4,85; 4,93	,, 6,09; 6,25%
	Ber. C—CH ₃ 3,35%	O—CH ₃ 6,91%	Cl 7,90%
	Gef. C—CH ₃ 3,23%	O—CH ₃ 6,58%	Cl 7,92%
$[\alpha]_D^{20} = +154^\circ \pm 4^\circ; +155^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,745$, Aceton, $l = 1$ dm)			

Das aus *R. obscura* ausgefällte Perchlorat wurde, wie dasjenige aus *R. vomitoria*, umkristallisiert. Die beiden Perchlorate stimmten in Farbe, Kristallform und Löslichkeiten miteinander überein. Zur Analyse wurde das Perchlorat aus *R. obscura* 3 Std. bei 80° und 0,03 mm getrocknet. Smp. 232—233°.

$C_{21}H_{20}O_3N_2 \cdot HClO_4$	Ber. C 56,19	H 4,72	N 6,24%
	Gef. ,, 56,15	,, 4,89	,, 6,11%
$[\alpha]_D^{20} = +151^\circ \pm 4^\circ; +153^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,975$, Aceton, $l = 1$ dm)			

Mischprobe der beiden Perchlorate: Smp. ohne Depression 232—233°. Zum Vergleich mit Alstonin stellten wir aus saurem Alstoninsulfat von Dr. *Elderfield* Alstoninperchlorat dar; dieses schmolz ebenfalls bei 232—233° und zeigte die gleichen Eigenschaften wie unsere beiden Perchlorate. Mischprobe aller drei Perchlorate: Smp. ohne Depression 232—233°.

Darstellung der freien Alstoninbase: Das freie Alstonin zersetzt sich beim Stehen in organischen Lösungsmitteln äusserst schnell unter Rotfärbung und blauer Fluoreszenz; es konnte deshalb bisher nie in kristalliner, analysenreiner Form erhalten werden. Die Reindarstellung gelang uns auf folgende Weise: 300 mg Alstoninnitrat (aus *R. vomitoria*), bzw. 300 mg Alstoninperchlorat (aus *R. obscura*) wurden in 40 cm³ Aceton bei Zimmertemperatur gelöst. Diese acetonische, gelbe Lösung wurde mit 100 cm³ Wasser und 10 cm³ 2-n. NaOH versetzt, was leichte orange Färbung der Lösung zur Folge hatte. Ohne von aussen Wärme zuzuführen, wurde das Aceton am Vakuum abdestilliert; dabei kristallisierte das Alstonin in feinen, orangegelben Nadelchen, die abfiltriert und neutral gewaschen wurden. Ausbeute: ca. 210 mg Base, Smp. 205—210° (Zers.).

Ca. 40—50 mg der im Exsikkator über Calciumchlorid während 3 Std. leicht angetrockneten Base wurden in je ca. 2 cm³ reinem Aceton durch sehr schwaches Erwärmen unter Stickstoff gelöst. Die orangegelbe Lösung wurde unter Stickstoff faserfrei filtriert und im Eis-Kochsalz-Gemisch durch Anreiben zum Kristallisieren gebracht. Ausbeute: ca. 15 mg gelbes, kristallines Alstonin. Die Mutterlauge färbte sich sehr schnell dunkelrot und begann bläulich zu fluoreszieren. Das kristalline Alstonin zeigte ab ca. 220° Braun-, ab ca. 260° Schwarzfärbung; die Kristalle behielten ihre Form jedoch bis über 300°. Zur Analyse wurde über Nacht bei Zimmertemperatur und 0,01 mm getrocknet.

$C_{21}H_{20}O_3N_2$	Ber. C 72,39	H 5,79	N 8,04%
	Gef. ,, 72,46	,, 5,80	,, 7,93%

Das UV.-Absorptionsspektrum des freien Alstonins stimmt mit demjenigen anderer quaternärer β -Carboline überein; es zeigt ebenfalls die drei typischen Maxima bei 250, 310 und 370 m μ ¹).

¹) *H. Schwarz & E. Schlittler*, Helv. **34**, 629 (1951).

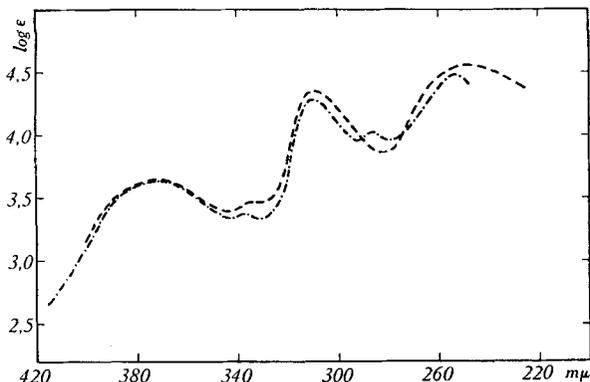


Fig. 1.

--- Alstonin (Äthanol).

- · - · - Alstonin-hydrochlorid (Äthanol, *Leonard & Elderfield*, loc. cit.).

Die in Paraffinöl und Chloroform aufgenommenen IR.-Spektren des kristallisierten Alstonins bestätigten nach der Lage ihrer Absorptionsbanden die von *Elderfield & Gray* (loc. cit.) aufgestellte Formel, mit Ausnahme der zur Carbomethoxy-Gruppe konjugierten Doppelbindung, für die wir die schon im theoretischen Teile vorgeschlagene Lage bevorzugen würden.

Hydrierung des freien Alstonins zum Py-tetrahydro-alstonin: Je 200 mg Alstoninperchlorat aus *R. obscura* und Alstoninnitrat aus *R. vomitoria* wurden in die freie Base umgewandelt. Die neutral gewaschenen Basen wurden unter Stickstoff in je ca. 7 cm³ absolutem Methanol gelöst; die Lösungen wurden faserfrei filtriert, unter Stickstoff mit methanolischer KOH auf pH 10 gebracht und mit 20 mg Platinoxid versetzt. Die letzten Operationen wurden direkt in dem zur Hydrierung verwendeten Gefäß durchgeführt. Da sich das Alstonin in alkalischer Lösung an der Luft sofort zersetzt, durfte diese Lösung nicht mehr umgegossen werden. Die orangerote Lösung nahm im Verlauf von 8 Std. 2 Mol. Wasserstoff unter Entfärbung auf. Das Hydrierungsprodukt kristallisierte zum Teil aus. Die Reaktionslösung wurde mit ca. 10 cm³ Methanol verdünnt und die ausgeschiedenen Kristalle durch Erwärmen wieder in Lösung gebracht. Vom Platin wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt, bis Kristallisation eintrat. Dann wurde erhitzt, mit gleicher Menge Wasser versetzt und der Kristallisation überlassen. In beiden Fällen resultierte als Endprodukt Py-tetrahydro-alstonin, das mit authentischen Proben von Dr. *Elderfield* identifiziert werden konnte.

C₂₁H₂₄O₃N₂ (aus *R. vomitoria*), zur Analyse dreimal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Farblose Substanz, Smp. 225–226°, 24 Std. bei Zimmertemperatur und 0,01 mm getrocknet.

Ber. C 71,57 H 6,86 N 7,95%

Gef. „ 71,44 „ 6,94 „ 7,95%

$[\alpha]_D^{20} = -115^{\circ} \pm 4^{\circ}; -116^{\circ} \pm 4^{\circ}$ ($c = 1,005$, Chloroform, $l = 1$ dm)

C₂₁H₂₄O₃N₂ (aus *R. obscura*), zur Analyse ebenfalls dreimal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. In Farbe, Kristallform und Löslichkeiten übereinstimmend mit dem aus *R. vomitoria* erhaltenen Produkt. Smp. 225–226°. 24 Std. bei Zimmertemperatur und 0,01 mm getrocknet.

Ber. C 71,57 H 6,86 N 7,95%

Gef. „ 71,37 „ 7,04 „ 7,85%

$[\alpha]_D^{22} = -109^{\circ} \pm 6^{\circ}; -109^{\circ} \pm 6^{\circ}; -107^{\circ} \pm 6^{\circ}$ ($c = 0,52$, Chloroform, $l = 1$ dm)

Authentisches Py-tetrahydro-alstonin stimmte in Smp., Drehwerten und UV-Absorptionsspektrum mit unseren beiden Hydrierungsprodukten überein; Misch-Smp. aller drei Produkte ohne Depression.

Die Mikroanalysen wurden in den mikroanalytischen Laboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. *Gysel*) ausgeführt. Die Spektren verdanken wir den Herren Dr. *Gysel* (*CIBA AG.*) und P.-D. Dr. *Günthard* (*ETH.*). Ferner sind wir der *CIBA AG.* für das Ausgangsmaterial und dessen Extraktion, sowie Herrn Dr. *R. C. Elderfield* für die Überlassung von Alstoninproben zu grossem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Aus den Wurzeln, bzw. Rinden afrikanischer Rauwolfia-Arten (*R. vomitoria* und *R. obscura*) wurde Alstonin isoliert und durch kristallisierte Salze und Derivate charakterisiert.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

35. Über Steroide.

109. Mitteilung¹⁾.

Papierchromatographie von schwach polaren Steroiden

von **R. Neher** und **A. Wettstein**.

(14. XII. 51.)

Die von *R. Conden*, *A. H. Gordon* & *A. J. P. Martin*²⁾ entwickelte Methode der Papierchromatographie³⁾ findet mit ausgezeichnetem Erfolg Anwendung zur Trennung und Identifizierung von Aminosäuren, Zuckern und anderen wasserlöslichen Verbindungen. In ihrer ursprünglichen Form eignet sie sich aber nicht ohne weiteres für Steroide oder andere in Wasser schwer oder nicht lösliche Substanzen, da deren Verteilung zwischen der stationären wässrigen und der mobilen organischen Phase weitgehend zugunsten letzterer erfolgt. Die betreffenden Verbindungen bewegen sich deshalb hauptsächlich mit der Lösungsmittelfront.

Zwar hat man mit Hilfe wässriger, meist komplizierter Lösungsmittelsysteme versucht, gewisse Steroide zu chromatographieren⁴⁾⁵⁾⁶⁾; eine wirksame Trennung konnte

¹⁾ 108. Mitteilung, *Helv.* **34**, 2286 (1951).

²⁾ *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).

³⁾ Übersichten: *A. J. P. Martin*, *Ann. Rev. Biochemistry* **19**, 517 (1950); *R. T. Williams* & *R. L. M. Synge*, Ed., *Biochemical Society Symposia No. 3, Partition Chromatography*, Cambridge, University Press 1950; *F. Cramer*, *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1952.

⁴⁾ *J. M. McMahon*, *R. B. Davis* & *G. Kalinsky*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**, 799 (1950).

⁵⁾ *J. F. Nyc*, *J. B. Garst*, *H. F. Friedgood* & *D. M. Maron*, *Arch. Biochem.* **29**, 219 (1950).

⁶⁾ *A. C. Haskin*, *A. J. Shermann* & *W. M. Allen*, *J. Biol. Chem.* **182**, 429 (1950). In diesem Falle handelt es sich lediglich um eine Trennung von Progesteron und Sesamöl.