

Zusammenfassung.

Die Säurenatur des Diazoniumions wird diskutiert. Am Beispiel von p-Chlorphenyldiazoniumion und m-Sulfophenyldiazoniumion lässt sich zeigen, dass das Diazoniumion sich wie eine zweibasische Säure verhält, deren erste Dissoziationskonstante sehr viel kleiner ist als die zweite.

Es folgt daraus, dass das Diazoniumion beim Erreichen des Umlagerungsgebietes direkt in das normale Diazotat übergeht. Die Zwischenstufe, das Diazohydroxyd, wird dabei nur in verschwindend kleinem Anteil gebildet.

Die Abhängigkeit der Konzentration des Diazoniumions vom pH wird berechnet. Nach der Umlagerung ins Diazotat nimmt die Konzentration des Diazoniumions um 2 Zehnerpotenzen pro pH-Einheit ab.

Die Kupplungsgeschwindigkeit ist im Bereich von $\text{pH} = 4,5$ bis 13,2 proportional der Diazoniumionkonzentration, sie nimmt deshalb oberhalb des Gebietes der Diazo-Umwandlung ebenfalls um 2 Zehnerpotenzen pro pH-Einheit ab.

Das normale Diazotat kuppelt nicht, oder nur mit sehr geringer Geschwindigkeit. Da das Diazohydroxyd in Wasser nur in einem sehr geringen Anteil der gesamten Diazokomponente existieren kann, kann dessen eventuelles Kupplungsvermögen nicht nachgewiesen werden.

Analytische und wissenschaftliche
Laboratorien des Farbendepartements,
CIBA Aktiengesellschaft, Basel.

231. Über weitere aus Calebassen isolierte quartäre Alkaloide.

II. Mitteilung über Curare-Alkaloide aus Calebassen¹⁾

von H. Asmis, E. Bächli, E. Giesbrecht, J. Kebrle, H. Schmid und P. Karrer.

(16. IX. 54.)

Die folgenden Ausführungen schliessen an unsere Abhandlung über die Isolierung der Alkaloide aus Calebassen an, welche in *Helv.* **35**, 1864 (1953) veröffentlicht worden war. Das Alkaloidgemisch jener Calebassen, die aus dem oberen Amazonas-Gebiet stammten, war mittels Papierchromatographie in 5 Hauptfraktionen T_5 bis T_1 unterteilt worden²⁾. Aus den Fraktionen T_5 , T_4 und T_3 hatten wir 20 quartäre Calebassenalkaloide isoliert³⁾ (C-Alkaloid A, C-Alkaloid B,

¹⁾ 10. Mitteilung *Helv.* **37**, 553 (1954).

²⁾ *Helv.* **35**, 1866 (1952).

³⁾ Vgl. dazu auch *Helv.* **30**, 2081 (1947) (Aufarbeitung der „wasserlöslichen Reinekate“).

C-Alkaloid C, C-Alkaloid D, C-Alkaloid E, C-Toxiferin, C-Alkaloid F, C-Alkaloid G, C-Alkaloid H, C-Calebassin, C-Alkaloid I, C-Curarin, C-Alkaloid J, C-Alkaloid K, C-Alkaloid UB, C-Calebassinin, C-Fluorocurin, C-Fluorocurinin, C-Fluorocurarin und C-Alkaloid L).

Im folgenden berichten wir über einige Alkaloide, die wir aus solchen Alkaloidfraktionen verschiedener Calebassen isolierten, welche im Papierchromatogramm schnell wandern. Zum Teil stammen sie aus neu verarbeiteten Calebassen, deren Herkunft nicht genau bekannt war, z. T. aus der Trenngruppe T₃ der früher¹⁾ untersuchten Calebasse N III¹⁾.

Aus den Fluorocurin-haltigen Fraktionen konnten wir Mavacurin isolieren, welches *Th. Wieland & H. Merz*²⁾ früher aus der südamerikanischen Droge Mavacure sowie aus einer Calebasse erhalten hatten. Dasselbe Alkaloid fanden wir auch in anderen Calebassen sowie in Rinden verschiedener südamerikanischer Strychnosarten und zwar stets zusammen mit C-Fluorocurin. Das gemeinsame Vorkommen von Mavacurin und C-Fluorocurin in verschiedenen Pflanzen ist von besonderem Interesse, da, wie wir kürzlich zeigten³⁾, zwischen ihnen biogenetische Beziehungen zu bestehen scheinen und Fluorocurin in vitro leicht in Mavacurin übergeführt werden konnte.

Aus der Fraktion des im Papierchromatogramm relativ rasch wandernden Alkaloidgemisches liess sich in sehr kleiner Menge ein neues quartäres Calebassenalkaloid als kristallisiertes Chlorid abtrennen, das wir als C-Alkaloid M bezeichnen. Sein UV.-Spektrum (Fig. 1) gleicht weitgehend demjenigen des C-Calebassinins⁴⁾. Es hat den R_c-Wert¹⁾ 1,45 im Lösungsmittel C⁵⁾, gibt mit konz. Schwefelsäure und Cer(IV)-sulfat keine deutlichen Farbreaktionen und besitzt in Dosen von 4,2 mg/kg Maus keine Curarewirkung. In allen diesen Eigenschaften ist es dem C-Calebassinin ähnlich. Die Gründe, warum es von Calebassinin als verschieden angesprochen werden muss, finden sich im experimentellen Teil beschrieben. Eine Analyse konnte bisher aus Substanzmangel noch nicht ausgeführt werden.

In den rasch wandernden Alkaloidfraktionen unserer Calebassen fand sich ferner ein Alkaloid Y mit dem R_c-Wert 1,59 (Lösungsmittel C) bzw. 2,22 (Lösungsmittel D), das auch in der Rinde von *Strychnos toxifera* vorkommt und sich durch eine charakteristische rotviolette Cer(IV)-sulfat-Reaktion auszeichnet. Seine Kristallisation ist mit dem Chlorid gelungen (aus wässriger Lösung). Alkaloid Y gibt mit konz. Salpetersäure eine intensive Karminreaktion. Sein

1) *Helv.* **35**, 1864 (1952).

2) *B.* **85**, 731 (1952).

3) *Helv.* **37**, 553 (1954).

4) *Helv.* **30**, 2081 (1947); **36**, 102 (1953).

5) *Helv.* **33**, 512 (1950); **35**, 1868 (1952).

Spektrum (Fig. 1) ist dasjenige eines N(a)-substituierten Indolins; die Verbindung gehört daher zur Calebassin-Gruppe.

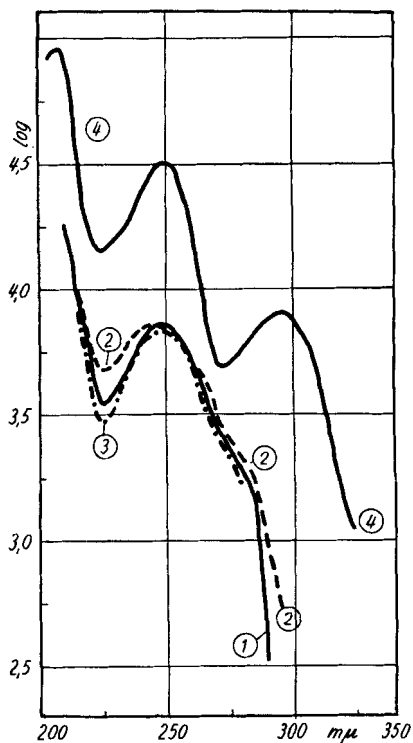


Fig. 1.

Kurve 1: C-Alkaloid-M-chlorid in Wasser, als Mol.Gewicht wurde 350 angenommen. $c = 3,2 \cdot 10^{-5}$ -m.

Kurve 2: C-Alkaloid-M-chlorid in 0,1-n. wässriger Natronlauge. $c = 3 \cdot 10^{-5}$ -m.

Kurve 3: C-Alkaloid-M-chlorid in 0,1-n. wässriger Salzsäure. $c = 2,7 \cdot 10^{-5}$ -m.

Kurve 4: C-Alkaloid Y. log ϵ -Werte unbekannt.

Dem Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und der Eidg. Volkswirtschaftsstiftung danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil.

Gemeinsame Aufarbeitung verschiedener Calebassen: 9 Calebassen unbestimmter Herkunft (766 g), die sich auf Grund von Papierchromatogrammen als miteinander nahe verwandt erwiesen, hat man nach dem Anteigen mit Wasser erschöpfend mit kaltem Methanol extrahiert. Der Extrakt (635 g) gab nach *J. J. Panouse*¹⁾ bei pH ~ 2 240 g Reineckate. Der Aceton-lösliche Anteil der Reineckate (211 g) lieferte nach *J. Kapfhammer*²⁾ et al. 110 g Rohchloride. Diese haben wir in ca. 1 l Äthanol gelöst und die Lösung über 500 g neutralem Aluminiumoxyd³⁾ filtriert und solange mit Alkohol nachgewaschen (4 l), bis das Eluat nur noch eine schwache Cer(IV)-sulfat-Reaktion gab. Das eingedampfte Eluat (A_1) wog 72 g. Durch Nachwaschen mit Methanol und Methanol-Wasser erhielt man noch 15 g harzige Substanz ($B_1 + C_1$). Hierauf hat man die Fraktion A_1 in 300 ml Äthanol nochmals über 1 kg Aluminiumoxyd³⁾ filtriert, wobei man Eluat-

¹⁾ Bl. 1949, 595.

²⁾ Z. physiol. Ch. 191, 182 (1930).

³⁾ Aluminiumoxyd (*Brockmann*) wurde längere Zeit mit 2-n. Salzsäure verrührt, dann neutral gewaschen und bei 100° getrocknet.

fraktionen von je 400 ml auffing. Die ersten zwei Fraktionen, die zusammen 38 g Trockenrückstand enthielten, wurden weiter verarbeitet (A_{11}). Die nächste Fraktion enthielt 4,5 g Substanz (A_{12}), die nächsten 5 Fraktionen 3,5 g Rückstand (A_{13}). Mit Methanol- und Methanol-Wasser liessen sich noch 18,3 g harziges Material eluieren ($A_{14} + A_{15}$).

Die Fraktion A_{11} hat man an 350 g Cellulosepulver (aschefrei; *Whatman*-Standard-Grade) adsorbiert¹⁾, die Masse über Nacht den Dämpfen des Lösungsmittelgemisches „C“ ausgesetzt und dann auf eine Säule (200 × 8,3 cm) von 4 kg Cellulosepulver aufgetragen, die vorher mit „C“ klimatisiert worden war. Das Chromatogramm lief mit „C“ und lieferte in 25 Tagen ca. 250 Fraktionen zu ca. 350 ml; gegen Schluss hat man das Lösungsmittel nach und nach durch Zugabe von Methanol verstärkt. Die einzelnen Fraktionen hat man entsprechend dem Ausfall der Papierchromatogramme in 20 Anteile aufgeteilt:

H 0	4,96 g (z.g. Teil tertiär)	H 7	0,8 g	H 14	1,1 g
H 1	0,7 g	H 8	1,75 g	H 15	0,6 g
H 2	0,55 g	H 9	3,55 g	H 16	0,57 g
H 3	1,1 g	H 10	2,48 g	H 17	0,7 g
H 4	0,3 g	H 11	3,30 g	H 18	1,7 g
H 5	1,70 g	H 12	2,37 g	H 19	1,14 g
H 6	0,2 g	H 13	3,42 g		

Aus **H 3** erhielt man 570 mg C-Fluorocurarin-chlorid (Methanol-Äther). Aus **H 5** gewann man 1,43 g C-Fluorocurarin-Pikrat (Methyl-n-propylketon). Aus den Fraktionen **H 7–H 11** liessen sich 4,9 g C-Curarin-chlorid (Methanol-Äther) und 680 mg C-Calebassin-Pikrat abtrennen. 4,25 g C-Calebassin-Pikrat wurden auch aus den Fraktionen **H 12** und **H 13** gewonnen. Aus **H 18** liessen sich 20 mg C-Alkaloid-C-chlorid erhalten (Wasser-Aceton).

Von den übrigen H-Fractionen und den Mutterlaugen der oben erwähnten Fraktionen gelangten bisher die Fraktionen **H 1** und **H 2** sowie die Mutterlaugen (ML) der Fraktionen **H 3** und **H 8** zur weiteren Untersuchung.

Weitere Auftrennung von ML **H 8**: Diese in Pikratform vorliegende Fraktion hat man zunächst durch Filtration über Amberlit IRA-400 (Chlorid-Form) in die Chloride übergeführt und diese an 159 g Cellulosepulver mittels Lösungsmittel „C“ chromatographiert. Das fraktioniert aufgefangene Eluat wurde in 24 Fraktionen (W_1 – W_{24}) aufgeteilt, die folgende Mengen an Alkaloiden enthielten:

W_1	22,4 mg	W_7	101 mg	W_{13}	32 mg	W_{19}	72 mg
W_2	6,6 mg	W_8	31 mg	W_{14}	15 mg	W_{20}	4,4 mg
W_3	6,2 mg	W_9	44 mg	W_{15}	11 mg	W_{21}	8,0 mg
W_4	18,8 mg	W_{10}	31 mg	W_{16}	13 mg	W_{22}	6,2 mg
W_5	7,4 mg	W_{11}	68 mg	W_{17}	23 mg	W_{23}	106,8 mg
W_6	94 mg	W_{12}	38 mg	W_{18}	10 mg	W_{24}	94,6 mg

Papierchromatogramme der Fraktionen W_6 und W_{13} zeigten, dass jede dieser Fraktionen mindestens 3–4 Alkaloide enthielt. Aus W_{10} , W_{11} , W_{12} und W_{13} schieden sich beim Eindampfen Kristalle in Form von feinen Nadeln aus. W_{10} und W_{11} enthielten zur Hauptsache C-Dihydro-toxiferin, W_{12} und W_{13} ein Alkaloid, das mit Cerisulfat keine momentane Farbreaktion gab. Es wird von uns mit C-Alkaloid **M** bezeichnet.

Zur Isolierung des C-Dihydro-toxiferinchlorids hat man die Fraktionen W_{10} und W_{11} dreimal aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 4,6 mg. Die Eigenschaften entsprachen den früher beschriebenen.

Die Fraktionen W_{12} und W_{13} hat man jede für sich aus Methanol umkristallisiert, hierauf die abzentrifugierten Kristalle vereinigt und noch dreimal aus Äthanol umkristalli-

¹⁾ Vgl. *Helv.* **35**, 1864 (1952).

sirt. Wir erhielten so 4 mg des C-Alkaloid-M-chlorides. Dieses ist in seinen Eigenschaften dem Calebassinin ausserordentlich ähnlich. Das Chlorid des neuen Stoffes kristallisierte aber im Gegensatz zu Calebassininchlorid nicht. Ein weiterer Unterschied liess sich folgendermassen nachweisen: Auf einem Papierstreifen *Whatman* Nr. 1 wurden nebeneinander Calebassininchlorid, C-Alkaloid-M-chlorid und die doppelte Menge Calebassininchlorid aufgetragen und das Chromatogramm nach der aufsteigenden und absteigenden Methode mit Lösungsmittel C entwickelt. Nach 4 1/2 Std. hat man mit Jodlösung, hierauf, nach dem deutlichen Erscheinen brauner Flecken, mit Cerisulfat angesprüht, wodurch die braune Farbe allmählich verschwand. Dort, wo die Mischung von Calebassinin und C-Alkaloid M aufgetragen worden war, konnte man deutlich zwei Konzentrationszentren wahrnehmen, in den anderen Chromatogrammen nur eines. Die gemessenen Rf-Werte waren: C-Calebassinin 0,15, C-Alkaloid M 0,13.

Der R_c -Wert des C-Alkaloids M in Lösungsmittel C berechnet sich aus dem R_c -Wert des Calebassinins und dem obigen R_f -Wert zu 1,45.

C-Alkaloid M gibt mit konz. Schwefelsäure und Cerisulfat keine Farbreaktion. Cerisulfat allein ruft nach mehreren Std. eine schwache Orangefärbung hervor. — Im Spektrum stimmen Calebassinin und C-Alkaloid M nahezu überein (Fig. 1).

Aus den Mutterlaugen der Fraktionen W_{10} , W_{11} , W_{12} und W_{13} wurden noch einige Milligramme dieser Verbindung isoliert. Das C-Alkaloid M zeigte bei einer Dosis von 4,2 mg/kg Maus keine Curare-Aktivität.

Die Fraktion W_7 lieferte nach der Überführung in das Pikrat noch 14,6 mg Calebassinin-Pikrat (Aceton-Wasser).

Weitere Aufarbeitung der Fraktionen H_1 , H_2 und $ML H_3$. Diese drei als Chloride vorliegenden Fraktionen hat man mit einer entsprechenden, aus der Calebasse N III stammenden Fraktion $T_{3,2}$ (siehe unten) vereinigt und mit „C“ an 200 g Cellulosepulver chromatographiert. Die erreichte Auftrennung war aber ungenügend, so dass man die einzelnen Eluatfraktionen in 3 Hauptfraktionen S_1 (48 mg), S_2 (1850 mg) und S_3 (74 mg) zusammenfasste.

Fraktion S_2 enthielt Mavacurin, zusammen mit etwas Fluorocurin, Fluorocurarin, und Fluorocurinin. Wir haben diese Fraktion mit einem Lösungsmittelgemisch D II (Essigester : Pyridin : Wasser = 10 : 2,3 : 1,69 Volumteile) erneut an 326 g Cellulosepulver chromatographiert. Die einzelnen aufgefangenen Fraktionen wurden auf Grund von Tüpfelreaktionen mit Cerisulfat- und Zimtaldehydlösungen in 9 Fraktionen $S_{2,1}$ bis $S_{2,9}$ zusammengefasst:

$S_{2,1}$ 75 mg	$S_{2,4}$ 170 mg	$S_{2,7}$ 190 mg
$S_{2,2}$ 52 mg	$S_{2,5}$ 432 mg	$S_{2,8}$ 88 mg
$S_{2,3}$ 126 mg	$S_{2,6}$ 693 mg	$S_{2,9}$ 22 mg

Die Fraktionen $S_{2,4}$, $S_{2,5}$ und $S_{2,6}$ zeigten die für Mavacurin charakteristische intensiv karminrote Färbung mit Zimtaldehyd und Salzsäure, am reinsten Fraktion $S_{2,6}$. Aus dieser Fraktion $S_{2,6}$ wurde in wässriger Lösung das Pikrat gefällt und dieses nach dem Trocknen aus Methyläthylketon umkristallisiert (Auswaschen mit Methyläthylketon und Methanol). Ausbeute 504 mg. Aus Fraktion $S_{2,5}$ liessen sich in gleicher Weise 245 mg C-Mavacurinpicrat gewinnen. Gesamtausbeute 749 mg. Aus $S_{2,4}$ liess sich kein kristallisiertes Pikrat abtrennen.

Die Fraktionen $S_{2,7}$, $S_{2,8}$ und S_3 enthielten eine Verbindung, die mit Cerisulfat eine rotviolette Farbreaktion gab, die über Gelb nach Gelbgrün verblasste. Wie Papierchromatogramme zeigten, war sie identisch mit einem aus einer *Strychnostoxifera*-Spezies isolierten Substanz.

Zu ihrer Isolierung wurden die 3 Fraktionen $S_{2,7}$, $S_{2,8}$ und S_3 vereinigt und an Cellulosepulver chromatographiert (159 g Cellulosepulver, Lösungsmittelgemisch „C“). Auf Grund der Tüpfelreaktionen mit Cerisulfat wurden die Eluate in 20 Fraktionen aufgeteilt, die folgende Substanzmengen enthielten:

U ₁ 24,6 mg	U ₆ 35,6 mg	U ₁₁ 52,8 mg	U ₁₆ 9,0 mg
U ₂ 3,2 mg	U ₇ 15,2 mg	U ₁₂ 5,6 mg	U ₁₇ 3,0 mg
U ₃ 8,6 mg	U ₈ 9,4 mg	U ₁₃ 12,8 mg	U ₁₈ 29,2 mg
U ₄ 9,0 mg	U ₉ 28,8 mg	U ₁₄ 9,8 mg	U ₁₉ 12,8 mg
U ₅ 19,2 mg	U ₁₀ 72,8 mg	U ₁₅ 1,2 mg	U ₂₀ 25,6 mg

Fraktion U₄ zeigte mit Cerisulfat eine ziegelrote Farbreaktion, gelb verblassend. Papierchromatographisch erwies sie sich einheitlich; wir konnten aber weder ein kristallisiertes Pikrat noch ein Chlorid darstellen.

Aus Fraktion U₅ wurden 5 mg Mavacurinpicrat erhalten.

Die Fraktionen U₁₀ und U₁₁ lieferten 49 mg C-Fluorocurinchlorid.

Das neue Alkaloid Y war in den Fraktionen U₁₈ und U₁₉ enthalten, in U₁₈ papierchromatographisch einheitlich. Es kristallisiert als Chlorid; weitere Eigenschaften finden sich oben erwähnt.

Aufarbeitung der Trenngruppe T₃ aus Calebasse N III¹⁾: Diese Gruppe blieb anlässlich der Toluolaufarbeitung der Calebasse N III noch ununtersucht¹⁾. Im folgenden wird ihre Auftrennung beschrieben: Die Substanz, zusammen mit derselben Fraktion aus einer anderen Calebasse, im Gesamten 5,3 g Chloride, hat man mit Lösungsmittel „C“ an 1,3 kg Cellulosepulver chromatographiert und dabei in folgende Fraktionen aufgetrennt:

T _{3,1} 200 mg	T _{3,4} 1900 mg	T _{3,6} 800 mg
T _{3,2} 500 mg	T _{3,5} 250 mg	T _{3,7} 1000 mg
T _{3,3} 600 mg		

Die Weiterverarbeitung von T_{3,2} ist oben beschrieben worden. T_{3,3} gab aus Methanol-Äther 256 mg C-Fluorocurinchlorid. T_{3,4} lieferte nach der Überführung in das Pikrat 916 mg C-Fluorocurinpikrat, während man aus T_{3,6} 380 mg C-Calebassinipikrat gewann.

Zusammenfassung.

Aus den im Papierchromatogramm schnell wandernden Alkaloid-Fraktionen verschiedener Calebassen wurden Mavacurin und ein neues, als C-Alkaloid M bezeichnetes quartäres Calebassen-Alkaloid, das mit C-Calebassinin nahe verwandt ist, isoliert. Ferner konnte ein Alkaloid Y auf chromatographischem Wege abgetrennt werden, das auch in der Rinde von *Strychnos toxifera* vorkommt und durch eine rotviolette Cer(IV)-sulfat-Reaktion ausgezeichnet ist.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ Helv. **35**, 1864 (1952).