

## 149. Über eine einfache und rasche, quantitative Bestimmung von Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub>

3. Mitteilung über quantitative, spektrophotometrische Bestimmungsmethoden<sup>1)</sup>

von H. G. Leemann und K. Stich

(11. IV. 62)

Die heute gebräuchlichen Bestimmungsmethoden für Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub> weisen in mancher Hinsicht Nachteile auf. So ist die biologische Analyse nach SHIPLEY & PARK<sup>2)</sup> zeitraubend und kostspielig, während die kolorimetrischen Methoden, beispielsweise mit SbCl<sub>5</sub> nach WILKIE, JONES & KLINE<sup>3)</sup>, mit J<sub>2</sub> und C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> nach LYNES & QUACKENBUSH<sup>4)</sup> oder mit Furfurol und Schwefelsäure nach LAUGHLAND & PHILLIPS<sup>5)</sup>, wohl rasch und billig, jedoch relativ unspezifisch und auch wenig empfindlich sind. Die Schwierigkeiten, die mit der Bestimmung von Vitamin D verbunden sind, kommen in der zusammenfassenden Arbeit von JANECKE & MASS-GOEBELS<sup>6)</sup>, die als Farbreagens Phosphorwolframsäure verwenden, deutlich zum Ausdruck.

Die Notwendigkeit, Reihenbestimmungen von kleinen Mengen von Vitamin D<sub>2</sub> durchzuführen, hat uns daher veranlasst, nach einer Methode zu suchen, die die eingangs erwähnten Nachteile nicht in dem Masse aufweist.

Unsere Zielsetzung, eine einfache Routinemethode auszuarbeiten, die gestattet, Vitamin D<sub>2</sub> in der Grössenordnung von 1–100 µg zu bestimmen, beschränkte die Arbeitsmöglichkeiten von vornherein auf die Papier- oder Dünnschichtchromatographie. Dabei ist uns die Beobachtung zugute gekommen, dass der Rf-Wert von Vitamin D<sub>2</sub> auf Papier mit apolaren Lösungsmitteln als mobile Phase, wie beispielsweise Petroläther, von der Menge des aufgetragenen Vitamins abhängig ist. Weder JANECKE & MASS-GOEBELS<sup>6)</sup>, deren Arbeit auf Seite 169 eine Photographie eines Dünnschichtchromatogramms wiedergibt, die eine deutliche Abhängigkeit des Rf-Wertes von der Konzentration an Vitamin D<sub>2</sub> zeigt, noch MAYER, PICARD & WOKES<sup>7)</sup>, die bei der von ihnen beschriebenen «reversed-phase chromatography» diese Anomalie im Text erwähnen, haben diese zur Ausarbeitung einer quantitativen Analyse-methode für D-Vitamine ausgewertet.

Unsere oben erwähnte Beobachtung, die wohl auf einen stark konzentrations-abhängigen Verteilungskoeffizienten von Vitamin D<sub>2</sub> zwischen der mobilen apolaren Phase und dem im Papier enthaltenen Wasser als stationäre Phase zurückzuführen ist, wurde in der Folge durch zahlreiche Papierchromatographien systematisch untersucht.

<sup>1)</sup> 2. Mitteilung: H. G. LEEMANN & H. WELLER, *Helv.* **43**, 1359 (1960).

<sup>2)</sup> P. G. SHIPLEY & E. A. PARK, *J. biol. Chemistry* **51**, 41 (1922).

<sup>3)</sup> J. B. WILKIE, S. W. JONES & O. E. KLINE, *J. Amer. pharmaceut. Assoc.* **47**, 385 (1958).

<sup>4)</sup> W. I. LYNES & F. W. QUACKENBUSH, *Analyt. Chemistry* **27**, 1978 (1955).

<sup>5)</sup> D. H. LAUGHLAND & W. E. J. PHILLIPS, *Analyt. Chemistry* **28**, 817 (1958).

<sup>6)</sup> H. JANECKE & I. MASS-GOEBELS, *Z. analyt. Chem.* **178**, 161 (1960).

<sup>7)</sup> A. MAYER, C. W. PICARD & F. WOKES, *Pharmaceut. Acta Helv.* **33**, 603 (1958).

Als erstes galt es abzuklären, innerhalb welchen Mengenbereiches dieser Effekt – Menge Vitamin  $D_2$ /unterschiedliche Laufstrecke – zur quantitativen Bestimmung herangezogen werden kann.

Unter Konstanthaltung aller die Papierchromatographie beeinflussenden äussern Umstände<sup>8)</sup> zeigte es sich, dass die unterschiedliche Laufstrecke für die quantitative Bestimmung von Vitamin  $D_2$  im Bereich von 1–100  $\mu\text{g}$  tatsächlich zu Hilfe gezogen werden kann, wobei der optimale Bereich zwischen 1 und 15  $\mu\text{g}$  liegt.

Allerdings erwies sich die Laufstrecke von Vitamin  $D_2$  auch sehr stark abhängig von der Konzentration der für die Analyse aufgetragenen Lösung und somit letztendlich von der Fleckengrösse an der Auftragsstelle (Fig. 1).

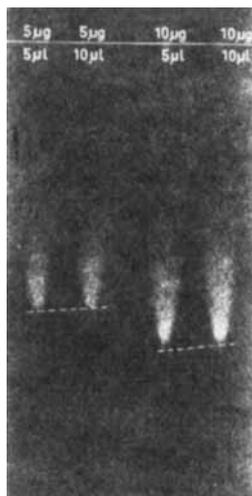


Fig. 1. Abhängigkeit der Laufstrecke von Vitamin  $D_2$  von Menge und Konzentration

Es drängte sich daher auf, das Volumen der auf das Papier aufzutragenden Lösung von Vitamin  $D_2$  konstant zu halten. Aber auch unter Einhaltung dieser Massnahme war zunächst der statistische Fehlerbereich nicht tolerierbar. Der Grund für diese Unzulänglichkeit lag in der sehr schwer realisierbaren Klimatisierung der Chromatographierkammern. Eine auch über mehrere Stunden andauernde Klimatisierung im Dampf der mobilen Phase zeigte keine befriedigenden Resultate. Weder die Front des Lösungsmittels, die an und für sich schon schwer feststellbar ist, noch die Fronten der Substanzflecken liefen parallel zur Startlinie, ein Umstand, der die genaue Auswertung der Analysen nicht nur erschwerte, sondern auch eine zusätzliche Fehlerquelle darstellte.

Eine einwandfreie Klimatisierung der Chromatographierkammer konnte dadurch erzielt werden, dass die Kammerwände mit WHATMAN-3-Papier ausgeschlagen wurden und die Papierhülle unmittelbar vor Beginn des Chromatogramms mit der mobilen Phase getränkt wurde.

<sup>8)</sup> Raumtemperatur  $23 \pm 1^\circ$ , relative Raumfeuchtigkeit  $55 \pm 5\%$ .

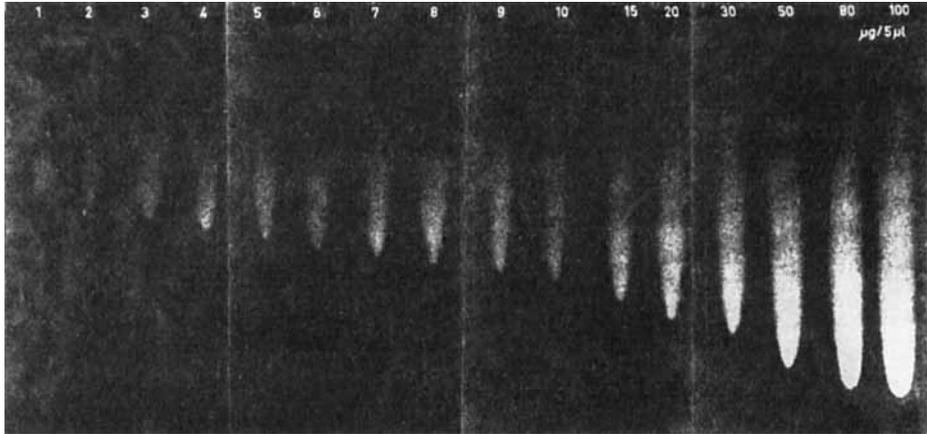


Fig. 2. Laufstrecken von Vitamin  $D_2$  in Abhängigkeit von Menge in gut klimatisierter Kammer

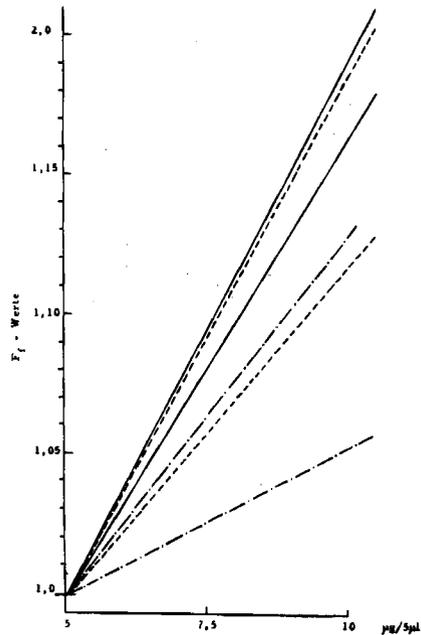


Fig. 3. Streuung der Messresultate (s. Text)

Fig. 2 zeigt, dass durch diese Massnahme die Laufdistanz der Substanzflecken logarithmisch proportional zur aufgetragenen Substanzmenge wird. Gleichzeitig kann dadurch aber auch ein merklich steiler verlaufender Gradient erzielt werden, was den Ablesefehler wesentlich verkleinert.

Fig. 3 gibt die Streuung der Messresultate von 10  $\mu\text{g}$  bzw. 7,5  $\mu\text{g}$  Vitamin  $D_2$  in bezug auf 5  $\mu\text{g}$  = 1 wieder. ( $F_f$  = Flux-Faktor; s. S. 1279).

Es wird daraus ersichtlich, dass unter Missachtung der Konstanthaltung des aufzutragenden Volumens für 10  $\mu\text{g}$  eine sehr grosse Streuung in Kauf genommen werden muss (strichpunktierter Fächer).

Der gestrichelte Fächer zeigt die Verminderung der Streuung bei Einhalten der Massnahme, während der ausgezogene Fächer die Streuung wiedergibt, die erhalten wird, wenn sowohl das Volumen konstant gehalten wird als auch für eine einwandfreie Klimatisierung gesorgt wird.

Unter den im experimentellen Teil angegebenen Standardbedingungen lässt sich Vitamin  $\text{D}_2$  auch direkt in einem Vitamingemisch quantitativ bestimmen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Rf-Werte eines analysierten Substanzgemisches.

Rf-Werte verschiedener Vitamine

Vitamin-A-Alkohol	0	Vitamin $\text{D}_2$ (5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ )	0,40*
Vitamin-A-acetat	1	Vitamin $\text{D}_3$ (5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ )	0,43*
Vitamin $\text{B}_1$	0	$\alpha$ -Tocopherol	0,76
Vitamin $\text{B}_2$	0	$\alpha$ -Tocopheryl-acetat	0,86
Vitamin $\text{B}_6$	0	Ergosterin	0,3
*) Fleckenfront.			

Begreiflicherweise lassen sich die Vitamine  $\text{D}_2$  und  $\text{D}_3$  unter diesen chromatographischen Bedingungen nicht auftrennen, dagegen stören die übrigen untersuchten Vitamine die quantitative Bestimmung von Vitamin  $\text{D}_2$  oder Vitamin  $\text{D}_3$  nicht.

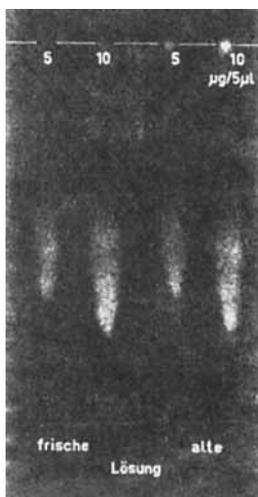


Fig. 4. Verhalten von frischer bzw. alter Vitamin- $\text{D}_2$ -Lösung bei der Bestimmung

Dass mit der beschriebenen Bestimmungsmethode tatsächlich nur das aktive Prinzip – Vitamin  $\text{D}_2$  – bestimmt wird, zeigt Fig. 4, die die Photographie eines Papierchromatogramms einer frischen Lösung von Vitamin  $\text{D}_2$  neben einer gestandenen Lösung zeigt. Die Sekundärprodukte bleiben unter den beschriebenen Be-

dingungen auf der Startlinie sitzen. Entgegen den Beobachtungen von MAYER<sup>7)</sup> treten in der von uns beschriebenen Analysenmethode während des Chromatogramms keine Zersetzungsprodukte von Vitamin D<sub>2</sub> auf.

Bei der Ausarbeitung dieser Analysenmethode ist uns der von REICHSTEIN und Mitarb.<sup>9)</sup> entwickelte Spektrophotograph für Papierchromatogramme, der von uns weiter ausgebaut wurde, zustatten gekommen.

Das Instrument besteht aus einem Quarz-Prismen-Monochromator, dessen Licht durch ein geeignetes Spiegelsystem auf eine Austrittsöffnung von 26 × 120 mm gleichmässig verteilt wird. Als Lichtquelle dient ein PHILIPS-Quecksilberbrenner vom Typ HPK 125 W. Spaltbreite und Belichtungszeit können variiert werden. Für die photographische Aufnahme wird das Papierchromatogramm über ein UV.-empfindliches Photopapier auf eine Trommel gespannt, die zur Belichtung vor der Austrittsöffnung rotiert<sup>10)</sup>.

Die untere kolorimetrische Erfassungsgrenze] liegt im günstigsten Fall, mit Phosphorwolframsäure, bei 5 µg, während es auf photographischem Weg durch Belichtung bei 254 mµ möglich ist, noch 1 µg Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub> sichtbar zu machen und somit, dank deren chromatographischem Verhalten, auch quantitativ zu bestimmen.

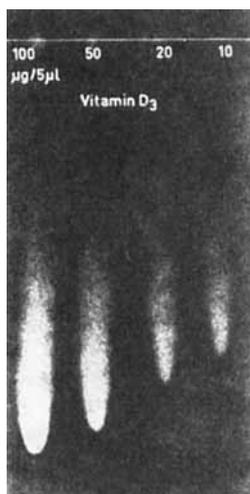


Fig. 5. Anwendung der Methode auf Vitamin D<sub>3</sub>

*Auswertung.* Da die Front der mobilen Phase nach erfolgtem Chromatogramm praktisch nicht feststellbar ist, kann zur Auswertung auch nicht der sonst übliche Rf-Wert verwendet werden. Wir haben daher eine andere Verhältniszahl gebildet ( $F_f$  = Flux-Faktor), die folgendermassen zustande kommt:

Zwei Vergleichslösungen an Vitamin D<sub>2</sub>, deren Konzentrationen sich der Einfachheit halber wie 1:2 verhalten, werden hergestellt, von denen je 5 µl aufgetragen und

<sup>9)</sup> Veröffentlichung vorgesehen.

<sup>10)</sup> Da für die photographische Aufnahme der Papierchromatogramme die Wellenlänge 254 mµ verwendet wird, kann zu diesem Zweck auch die Quecksilberlinie 254 mµ unter Verzicht eines Monochromators direkt als Beleuchtung verwendet werden. Geeignete Quecksilber-Niederdruckbrenner stehen in mehreren Fabrikaten zur Verfügung.

gleichzeitig mit der zu bestimmenden unbekanntem Vitaminlösung chromatographiert werden. Nach dem Chromatogramm wird die Laufstrecke (mm) der kleineren Konzentration als Basislinie gleich Eins gesetzt, während die Laufstrecke (mm) der höheren Konzentration dividiert durch die Laufstrecke (mm) der kleineren eine Zahl  $> 1$ , eben den Flux-Faktor  $F_f$ , ergibt. Mit der Laufstrecke der unbekanntem Lösung wird genau gleich verfahren. Werden diese  $F_f$ -Werte nun in ein Koordinatennetz eingetragen, dessen logarithmische Abszisse den Substanzmengen in  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  und dessen lineare Ordinate den Verhältnissen der Laufdistanzen entsprechen, so kann der Wert der unbekanntem Lösung direkt in  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  abgelesen werden.

Mit Hilfe eines praktischen Beispiels soll das eben Gesagte noch besser veranschaulicht werden.

*Erstes, orientierendes Chromatogramm* (Fig. 6). Aufgetragen werden:  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $x \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ .

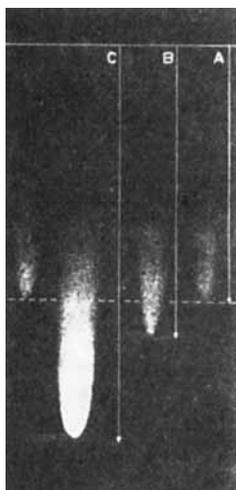


Fig. 6

*Orientierendes Chromatogramm*

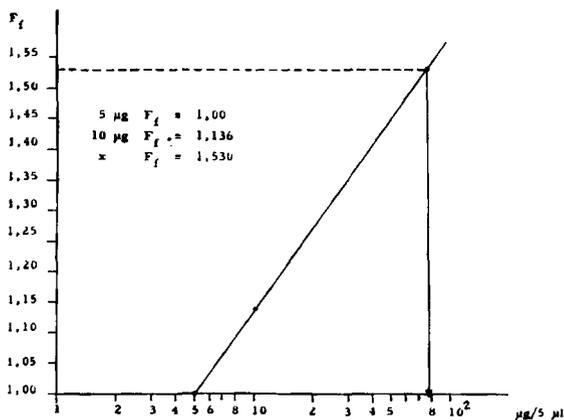


Fig. 7

*Auswertung des orientierenden Chromatogramms*

A = Distanz Auftragspunkt $\rightarrow$ Front	$5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 114,2 \text{ mm}$
B = Distanz Auftragspunkt $\rightarrow$ Front	$10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 130,0 \text{ mm}$
C = Distanz Auftragspunkt $\rightarrow$ Front	$x \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 175,5 \text{ mm}$

A:  $F_f$ -Wert = 1,00; B:  $F_f$ -Wert =  $B/A = 1,136$ ; C:  $F_f$ -Wert =  $C/A = 1,530$ .

Aus diesem ersten, orientierenden Chromatogramm geht hervor, dass die unbekanntem Lösung zwischen  $75$  und  $85 \mu\text{g}$  Vitamin  $D_2/5 \mu\text{l}$  enthält.

Um eine genaue Bestimmung durchführen zu können, wird nun die ursprüngliche, unbekanntem Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt ( $x/10$ ) und erneut wie oben chromatographiert.

*Zweites Chromatogramm* (Fig. 8). Aufgetragen werden:  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $x/10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ .

Werden die neuen  $F_f$ -Werte wiederum in das beschriebene Koordinatennetz eingetragen, so ergibt sich für die unbekanntem Lösung  $x/10$  ein Wert von  $8,05 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  Vitamin  $D_2$  (während sie nach Einwaage  $8,0 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  enthält), entsprechend 101% der Theorie.

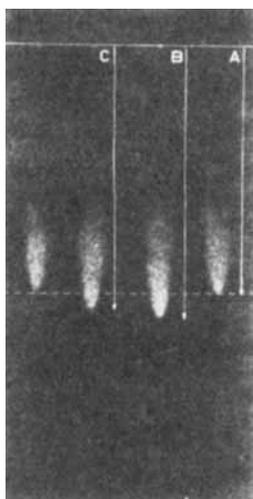


Fig. 8  
Zweites Chromatogramm

A = Distanz Auftragspunkt  $\rightarrow$  Front  $5 \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 110,0 \text{ mm}$   
 B = Distanz Auftragspunkt  $\rightarrow$  Front  $10 \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 121,5 \text{ mm}$   
 C = Distanz Auftragspunkt  $\rightarrow$  Front  $\frac{x}{10} \mu\text{g}/5 \mu\text{l} = 118,0 \text{ mm}$

A:  $F_T$ -Wert = 1,00; B:  $F_T$ -Wert =  $B/A = 1,104$ ; C:  $F_T$ -Wert =  $C/A = 1,072$ .

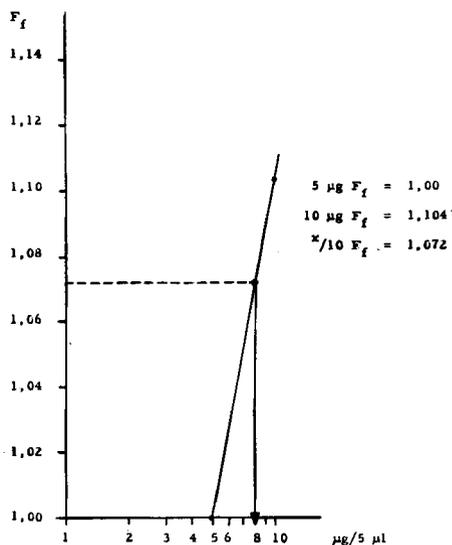


Fig. 9  
Auswertung des zweiten Chromatogramms

Liegen bereits Angaben vor über den mutmasslichen Gehalt an Vitamin  $D_2$ , wie dies beispielsweise bei der Analyse von Vitaminpräparaten der Fall ist, so wird die Durchführung des ersten, orientierenden Chromatogramms selbstverständlich überflüssig.

*Messfehler.* Unter genauer Einhaltung der im experimentellen Teil folgenden Angaben ergab sich aus 60 Papierchromatogrammen für die beschriebene Methode eine Streuung der Messresultate, die innerhalb  $\pm 3\%$  der Theorie liegen.

Der Arbeitsaufwand pro Analyse, ausschliesslich Herstellung der Lösungen, beträgt bis zur fertigen Auswertung etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden.

### Experimenteller Teil<sup>12)</sup>

1. Die Durchführung des Papierchromatogramms<sup>13)</sup>. Der chronologische Arbeitsablauf für die Durchführung eines Papierchromatogramms kann wie folgt beschrieben werden:

a) *Papier*: WHATMAN-2.

b) *Kammer*: Glaskammer für absteigende Chromatographie. Die Kammer wird auf die ganze Höhe mit Papier WHATMAN-3 ausgeschlagen. Der Boden wird mit einer ca. 3 cm hohen Schicht von mobiler Phase bedeckt.

<sup>12)</sup> Die Ausarbeitung der vorliegenden Analysenmethode wurde hauptsächlich von Fräulein L. MATHIES und Frau E. EMMINGER durchgeführt, deren experimentellem Geschick und vorbildlichem Einsatz das Gelingen dieser Arbeit weitgehend zu verdanken ist.

<sup>13)</sup> Wir sind uns bewusst, dass es sich im vorliegenden Fall nicht um eine eigentliche Papierchromatographie handelt, sondern vielmehr um eine Art Verteilungschromatographie.

<sup>14)</sup> Standardpräparat von 40 Millionen I. E. pro Gramm.  $1 \gamma$  Vitamin  $D_2$  entspricht sodann 40 I.E.

c) *Vorbereitung der Eichlösung*: Die Einwaage von Vitamin D<sub>2</sub><sup>14</sup>) in Petroläther wird so gewählt, dass die zu bestimmende unbekannte Menge Vitamin D<sub>2</sub> zwischen die beiden bekannten Eichlösungen, deren Konzentrationen sich wie z. B. 1:2 verhalten, zu liegen kommt. Nötigenfalls muss die ungefähre Menge Vitamin D<sub>2</sub> mittels eines ersten, orientierenden Chromatogramms bestimmt werden (s. unter f).

d) *Stationäre Phase*: 20 ml Wasser bidest. in 200 ml Aceton dest.

e) *Imprägnierung des Papiers*: In einer flachen Wanne wird der Papierstreifen 2 Min. mit der stationären Phase getränkt, sofort nach dem Herausnehmen zwischen dickem Filterpapier abgepresst und auf einem Rost liegend 6 Min. an der Luft trocknen gelassen.

f) *Auftragen*: Als Beispiel für c) diene nachfolgender Fall:

Die zu bestimmende Menge Vitamin D<sub>2</sub> liegt zwischen 5 und 10 µg. Nach den erwähnten 6 Min. Trockenzeit werden die vorbereiteten Lösungen mit selbstfüllenden Mikropipetten so aufgetragen, dass auf dem ersten und letzten Punkt je 5 µg in 5 µl, auf den zweiten Punkt 10 µg in 5 µl und auf den dritten Punkt die zu bestimmende Menge Vitamin D<sub>2</sub> ebenfalls in 5 µl aufgetragen werden.

g) *Mobile Phase*: Petroläther dest. mit Wasser bidest. gesättigt.

h) *Einhängen in die Kammer*: Zehn Min. nach Herausnahme der Streifen aus der Imprägnierflüssigkeit wird die Papierauskleidung der Kammer am oberen Ende ringsherum mit 20 ml Petroläther angefeuchtet, der vorbereitete Streifen eingehängt, die Kammer mit dem Deckel verschlossen und nach 5 Min. die mobile Phase durch das Loch im Deckel vorsichtig zugegeben.

Nach genau 60 Min. Laufdauer wird der Streifen herausgenommen und 5 Min. an der Luft trocknen gelassen.

2. *Photographieren*. Die getrockneten Streifen werden im UV.-Licht photographiert. Papier: GEVAERT Dokument-Rapid negativ.

λ: 254 mµ, Spalt offen (2 mm); Belichtungsdauer: ca. 20 Sek.

Entwickeln: in AGFA Copyrapid-Entwickler während ca. 10 Sek. Fixieren: 2 Min. in saurem Fixierbad. Wässern: 5 Min.

Als Dunkelkammerbeleuchtung muss rotes Licht gewählt werden.

3. *Farbreaktion* (anstatt Photographieren). Die getrockneten Streifen werden mit einer 20-proz. Lösung von Phosphorwolframsäure in Äthanol besprüht und 20 Min. bei 70° entwickelt. Die mit Vitamin D<sub>2</sub> beladenen Stellen erscheinen als braunrote Flecke.

4. *Auswertung*. Die Spitzen der beiden 5 µg-Flecke werden durch eine Gerade verbunden. Der jeweilige Abstand von dieser Geraden zum Auftragspunkt wird als Einheit betrachtet.

In ein Koordinatensystem (*x*-Achse logarithmisch: Substanzmenge in µg; *y*-Achse linear: Verhältnis Laufdistanz der Spitze des Flecks zur Einheit) wird der Wert des 10 µg Flecks eingetragen und durch eine Gerade mit dem Bezugspunkt (5 µg = 1) verbunden. Die der Verhältniszahl des unbekanntes Flecks entsprechende Vitamin-D<sub>2</sub>-Menge kann dann bequem aus dem Diagramm abgelesen werden.

#### SUMMARY

A very simple, accurate and quick assay method for Vitamin D<sub>2</sub> is described. The method is based on descending paper chromatography with petroleum ether saturated with water as mobile phase. The method benefits from the fact that the flow distance of the Vitamin D<sub>2</sub>-spots is very much dependent on the quantity of Vitamin D<sub>2</sub> placed on the chromatogram.

The different lengths of migration are directly used for the quantitative evaluation, the spots being made visible either by photography of the paperstrips at 254 mµ or illumination by an ordinary UV.-lamp and marking the front of the dark spots with a pencil, or by using phosphotungstic acid for a colour reaction.

Several other Vitamins have been shown not to interfere except Vitamin D<sub>3</sub>, of course. The method permits the determination of the intact Vitamins D<sub>2</sub> or D<sub>3</sub> respectively, regardless of degradation products being present in the original solution. During chromatography and evaluation no such additional degradation products are formed.

The method can be optimally used for amounts of Vitamins D<sub>2</sub> or D<sub>3</sub> varying between 2 and 15 µg, respectively, with an accuracy of ± 3%.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien  
SANDOZ AG., Basel 13

## 150. Aspidolimin

von M. Pinar und H. Schmid

(16. IV. 62)

*Aspidosperma limae* WOODS. (*Apocynaceae*) stellt eine neue *Aspidosperma*-Art dar, deren botanische Beschreibung offenbar noch nicht veröffentlicht worden ist. Die Droge mit dem Eingeborenennamen *Pitia mandioca* wurde von Prof. G. MARIZ, Recife (Brasilien) in den Wäldern von Doris Irmaos (Recife) gesammelt und von Prof. DARDANO DE LIMA (Rio de Janeiro) begutachtet. Herr Dr. J. SCHMUTZ (Bern) hat uns Wurzel- und Stammrinde dieser Pflanze für eine chemische Untersuchung überlassen.

Bei der Extraktion der Wurzelrinde mit essigsäurehaltigem Methanol erhielt man 3,9% tertiäre Alkaloide (bezogen auf das Gewicht der Droge). Auch eine noch nicht bestimmte Menge quartärer Alkaloide ist in der Droge enthalten. Eine erste dünnschichtchromatographische Prüfung der Fraktion der tertiären Alkaloide ergab, dass diese aus zwei Hauptalkaloiden und einer grösseren Zahl von Nebenalkaloiden zusammengesetzt ist. Der Alkaloidgehalt der Stammrinde ist wesentlich geringer als derjenige der Wurzelrinde; qualitativ sind aber keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

Die vorliegende Mitteilung betrifft die beiden Hauptalkaloide aus *Aspidosperma limae* WOODS. Das erste zu etwa 0,7–1% vorkommende Hauptalkaloid besitzt die Summenformel C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, den Smp. 150–151°, ein  $[\alpha]_D^{21} = +133^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>) und lieferte ein kristallisiertes Hydrochlorid C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>ClO<sub>3</sub>N<sub>2</sub> und ein bei 189–192° unter Zers. schmelzendes Pikrat C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>O<sub>10</sub>N<sub>5</sub>. Dem offenbar bisher noch nicht beschriebenen Alkaloid haben wir den Namen Aspidolimin (I) gegeben. Aspidolimin enthält eine Methoxygruppe, 1 aktiv. H-Atom und zwei C-Methylgruppen; sein UV.-Spektrum mit  $\lambda_{max}$  228 mµ (log ε = 4,43) und 264 mµ (log ε = 3,94) ist ähnlich demjenigen von Aspidospermin<sup>1)</sup>; auf Zusatz von Lauge wurde das langwellige Maximum nach 307 mµ (log ε = 3,73) verschoben. Im IR. findet sich eine Amidbande bei 1634 cm<sup>-1</sup>. Mit Pyridin-Essigsäureanhydrid bildete sich eine schlecht kristallisierende Acetylverbindung (II), mit IR.-Banden bei 1664 cm<sup>-1</sup> (>N-CO-R) und 1764 cm<sup>-1</sup> (phenol.-O-COCH<sub>3</sub>), die als schön kristallisierendes Pikrat charakterisiert wurde. Für Aspidolimin lässt sich auf Grund dieser Angaben, der Beob-

<sup>1)</sup> J. R. CHALMERS, H. T. OPENSHAW & G. F. SMITH, J. chem. Soc. 1957, 1115.